



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ

***IN VITRO* ЕФЕКАТ
НЕМАТОФАГНЕ ГЉИВЕ
DUDDINGTONIA FLAGRANS
НА ЖЕЛУДАЧНО-ЦРЕВНЕ
СТРОНГИЛИДЕ ОВАЦА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор:

Др Весна Лалошевић, редовни професор

Кандидат:

Станислав Симин, др вет.

Нови Сад, 2016. године

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број: РБР	
Идентификациони број: ИБР	
Тип документације: ТД	Монографска документација
Тип записа: ТЗ	Текстуални штампани материјал
Врста рада: ВР	Докторска дисертација
Име и презиме аутора: АУ	Станислав Симин, др вет.
Ментори: МН	Др Весна Лалошевић, редовни професор
Наслов рада: НР	<i>In vitro</i> ефекат нематофагне гљиве <i>Duddingtonia flagrans</i> на желудачно-цревне стронгилиде оваца
Језик публикације: ЈП	Српски (ћирилица)
Језик извода: ЈИ	Српски / енглески
Земља публикавања: ЗП	Република Србија
Уже географско подручје: УГП	Аутономна Покрајина Војводина
Година: ГО	2016.
Издавач: ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса: МА	Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 8.
Физички опис рада: ФО	8 поглавља / 186 страница / 48слика / 23 табеле / 16 графикона / 339 референци / без прилога
Научна област: НО	Ветеринарска медицина
Научна дисциплина: НД	Ветеринарска микробиологија и заразне болести животиња; Паразитологија
Предметна одредница, кључне речи: ПО	овце, желудачно-цревне стронгилиде, ивермектин, резистенција, <i>Duddingtonia flagrans</i> , MUCL 9827, редукција ларвица, тест копрокултуре.

УДК	636.09:633.13:582.288(043.3)
Чува се: ЧУ	У библиотеци Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду 21000 Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 8.
Важна напомена: ВН	Нема
<p>Извод: ИЗ</p> <p>Желудачно-цревне стонгилиде представљају један од најважнијих фактора који негативно утичу на здравље, добробит и економичност производње свих категорија оваца које се узгајају на пашњацима. Контрола паразитског гастроентеритиса (ПГЕ) се најчешће спроводи применом антихелминтика. Међутим, интензивна примена је довела до развоја резистенције код свих класа лекова, и представља значајан проблем на глобалном нивоу. Примена нематофагних гљива у редукцији броја ларвица на пашњаку, посебно врсте <i>Duddingtonia flagrans</i>, је једна од мера у оквиру интегрисане контроле паразита оваца. Гљива се даје овцама без обзира на ниво паразитизма, а ефекат је дозно-завистан. Према недавним подацима из литературе, редукција се чак смањује када однос између броја хламидоспора и јаја паразита (ХПГ:ЈПГ) у измету није оптималан.</p> <p>Циљ истраживања је утврђивање врста желудачно-цревних стонгилида и њиховог значаја на једној фарми оваца; провера ефикасности ивермектина који се најчешће користи у контроли ПГЕ на имању и провера хипотезе да се најбољи ефекат гљиве <i>in vitro</i> постиже формирањем доза заснованом на оптималном односу ХПГ:ЈПГ.</p> <p>Овце су клинички прегледане да се утврде симптоми ПГЕ. Паразитолошка испитивања и идентификација стронгилида су урађени стандардним копролошким техникама и прегледом одраслих облика из органа дигестивног тракта. Интензитет инвазије је процењен на основу налаза броја јаја и резултата копрокултуре. Способност FAMACHA© дијаграма да дијагностикује клиничку анемију је упоређена утврђивањем корелације са вредностима хематокрита. Ефикасност ивермектина против стронгилида и рода <i>Nematodirus</i> је испитана посебно, применом стандардног теста редукције јаја (FECRT). Нематофагна активност изолата <i>D. flagrans</i> MUCL 9827 је испитивана кроз интеракцију инфективних ларвица стронгилида са културом засејаном на 2% гладни агар. Утврђивање ХПГ:ЈПГ односа у којем <i>D. flagrans</i> MUCL 9827 доводи до оптималне редукције ларвица је урађено помоћу теста копрокултуре за дванаест природно заражених оваца, при чему је свака животиња посебна експериментална јединица. Испитане су четири дозе хламидоспора (0:1 (контрола); 2:1; 5:1; 10:1; 20:1), а за сваку дозу (однос) је урађено по 3 понављања.</p> <p>Код оваца на испитиваном имању паразитира 11 врста желудачно-цревних стронгилида:</p> <ul style="list-style-type: none"> - у сиришту: <i>Haemonchus contortus</i>, <i>Teladorsagia circumcincta</i> и <i>Trichostrongylus axei</i>; - у танком цреву: <i>Trichostrongylus colubriformis</i>, <i>Nematodirus spathiger</i>, <i>Nematodirus filicollis</i>, <i>Nematodirus abnormalis</i> и <i>Strongyloides papillosus</i>; - у дебелом цреву: <i>Chabertia ovina</i>, <i>Oesophagostomum venulosum</i> и <i>Trichuris discolor</i> <p>Доминантна врста током целе године је <i>H. contortus</i>, у просеку чини 72,3% популације а највиши ниво достиже у летњим месецима. Род <i>Trichostrongylus</i> је други по значају уз заступљеност од 17,6% и преовлађује у јесењим месецима. Клинички симптоми и патоанатомски налаз одговарају ПГЕ (<i>Trichostrongylidosis et strongylosis ventriculi et intestini ovium</i>). Интензитет инвазије је висок односно умерен за 31,7% и 28,4% прегледаних животиња, тим редом, што значи да је потребно је применити дехелминтизацију у 60,1% инвадираних оваца. Помоћу FAMACHA© дијаграма нису успешно идентификоване овце које су имале клиничку анемију због негативне корелације са вредностима хематокрита ($r_{ho}=-0,2446$, $p=0,0541$). Након теста редукције јаја (FECRT), установљено је да ефикасност ивермектина стронгилида износи око 80% (у распону од 67-99%). У односу на генеричку ефикасност, најмање је осетљив род <i>Trichostrongylus</i> (ПР(%)=33-80), резистенција коју додатно треба испитати постоји код <i>T. circumcincta</i> (ПР(%)=93; 95% ИП: 83-97), а сумња на резистенцију је установљена код <i>H. contortus</i> (ПР(%)=97; 95% ИП: 89-99). Резистенција</p>	

постоји и код рода *Nematodirus*, где је редукција јаја била 74% (95% ИП: 38-89). У *in vitro* условима, *D. flagrans* MUCL 9827 развија замке и хвата инфективне ларвице, што је утврђено на 2% гладном агару, али само у једној култури. *D. flagrans* MUCL 9827 је у тесту копрокултуре постигла дозно-зависну редукцију ларвица желуначно-цревних стронгилида оваца у распону од 11,31-29,02%, али та редукција није била значајна у односу на контролу ($p=0,827$). Проценат смањења броја ларвица за ХПГ:ЈПГ однос 10:1 је био 4% мањи у односу на ХПГ:ЈПГ однос 20:1, а забележена је и боља активност против ИВМ резистентних ларвица и најмањи број култура без икакве редукције.

Забележени клинички симптоми, употпуњени копролошким, патоанатомским и налазом интензитета инвазије потврђују да ПГЕ има значајан утицај на здравље, добробит и производне параметре оваца. Терапија ивермектином није довољно ефикасна у контроли стронгилида оваца на имању због присуства резистенције. Испитивани изолат гљиве испољава биолошки ефекат *in vitro*. Одређено је да је у датим условима теста копрокултуре оптимални ХПГ:ЈПГ однос 10:1. На основу резултата у *in vitro* условима, изолат *D. flagrans* MUCL 9827 није погодан за биолошку контролу желуначно-цревних стронгилида оваца.

Датум прихватања теме од стране НН већа: ДП	28. март 2014.
Датум одбране: ДО	
Чланови комисије: (име и презиме / титула / звање / назив организације / статус) КО	<p>Председник: _____ Др Иван Павловић, научни саветник, Научни институт за ветеринарство Србије, Београд;</p> <p>Ментор: _____ Др Весна Лалошевић, редовни професор, Пољопривредни факултет, Нови Сад;</p> <p>Члан: _____ Др Симонида Ђурић, доцент, Пољопривредни факултет, Нови Сад.</p>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. Thesis
Author: AU	Stanislav Simin, DVM, MSc
Mentor: MN	Dr Vesna Lalošević, full professor
Title: TI	<i>In vitro</i> effect of nematophagous fungus <i>Duddingtonia flagrans</i> on gastro-intestinal strongyles of sheep
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Republic of Serbia, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8.
Physical description: PD	8 chapters / 186 pages / 48 pictures / 23 tables / 16 graphs / 339 references / no supplementary files
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Veterinary microbiology and infectious diseases of animals; Parasitology
Subject, Key words SKW	Sheep, gastro-intestinal strongyles, ivermectin, resistance, <i>Duddingtonia flagrans</i> , MUCL 9827, larval reduction, coproculture assay

UDC	636.09:633.13:582.288(043.3)
Holding data: HD	Library of The Faculty of Agriculture, University of Novi Sad 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, Republic of Serbia
Note: N	None
<p>Abstract: AB</p> <p>Gastrointestinal strongyles represent one of the main factors which have negative impact on health, welfare and economics of production of all grazing sheep categories. The usual control measures of parasitic gastroenteritis (PGE) involve the use of anthelmintics. However, intensive exploitation of this approach has led to the development of resistance in all classes of drugs, which represents a significant problem globally. Reduction in larval numbers on the pastures using nematophagous fungi, particularly <i>Duddingtonia flagrans</i>, represents one of the promising measures of the integrated sheep parasite control. The fungus is administered to sheep regardless of parasite burden and the effect is dose-dependent. According to the recent literature data, reduction could even be decreased if the ratio between the number of chlamydospores and parasite eggs (CPG:EPG) in the feces is not optimal.</p> <p>The aim of this research was identification of the gastrointestinal strongyle species, and investigation of their impact on a particular sheep farm; determination of the efficacy of ivermectin which was the most frequently used drug for the control of PGE on the property and to check the hypothesis that the best effect of fungal treatment <i>in vivo</i> is achieved if dosage is based on the optimal CPG:EPG ratio.</p> <p>Sheep were clinically examined for the symptoms of PGE. Parasitological investigation and identification of strongyles were performed combining the standard coprological techniques and examination of the adult worms, collected from the gastrointestinal system of sheep. Evaluation of the intensity of the parasitic invasion was performed by combining the faecal egg counts and the results of coprocultures. Ability of FAMACHA[®] diagrams to diagnose clinical anemia was determined based on the correlation with the haematocrit values. The efficacy of ivermectin against strongyles and <i>Nematodirus spp.</i> was examined separately, using standard faecal egg count reduction test (FECRT). Nematophagous activity of <i>D. flagrans</i> isolate MUCL 9827 was examined through interaction of infective strongyle larvae with fungal culture grown on 2% water agar (WA). To determine CPG:EPG ratio at which larval reduction by <i>D. flagrans</i> MUCL 9827 is optimal, the coproculture assay was performed for 12 naturally infected sheep. Each animal was separate experimental unit. Four doses of chlamydospores were tested (0:1 (control); 2:1; 5:1; 10:1; 20:1), each at three repetitions.</p> <p>Eleven species of gastro-intestinal strongyles were found to parasitise sheep on the farm:</p> <ul style="list-style-type: none"> - in the abomasum: <i>Haemonchus contortus</i>, <i>Teladorsagia circumcincta</i> and <i>Trichostrongylus axei</i>; - in the small intestine: <i>Trichostrongylus colubriformis</i>, <i>Nematodirus spathiger</i>, <i>Nematodirus filicollis</i>, <i>Nematodirus abnormalis</i> and <i>Strongyloides papillosus</i>; - in the large intestine: <i>Chabertia ovina</i>, <i>Oesophagostomum venulosum</i> and <i>Trichuris discolor</i>. <p>The dominant species throughout the year was <i>H. contortus</i>, with 72.3% of average population which reaches the highest level in the summer months. <i>Trichostrongylus</i> is the second most important genus, comprising 17,6% of parasite population and reaching maximum levels during the autumn. Clinical symptoms and post-mortem findings corresponded to PGE (<i>Trichostrongylidosis et strongylosis ventriculi et intestini ovium</i>). Intensity of the invasion was high and medium in 31,7% and 28,4% of the examined animals, respectively, which means that 60,1% of sheep need anthelmintic treatment. Identification of sheep with clinical anemia using the FAMACHA[®] diagram was unsuccessful due to negative correlation with the haematocrit levels ($\rho=-0,2446$, $p=0,0541$). According to FECRT, the efficacy of ivermectin against the strongyles was approximately 80% (with the range of 67-99%). Genus based</p>	

efficacy calculations showed that the least sensitive was *Trichostrongylus* spp. (PR (%) = 33-80), resistance which requires further examination was found in *T. circumcincta* (PR (%) = 93; 95% CIs: 83-97) and that resistance was suspected in *H. contortus* (PR (%) = 97; 95% CIs: 89-99). Resistance was also observed in *Nematodirus* spp. with egg reduction level of 74% (95% CIs: 38-89)). *D. flagrans* MUCL 9827 showed trap development and subsequent trapping of infective larvae at tested *in vitro* conditions on 2% WA, but only in one plate. Dose dependent larval reduction in range of 11,31-29,02% was recorded after coproculture assay with *D. flagrans* MUCL 9827. However, this reduction was not considered significant, compared to the control (p=0,827). The percentage of larval reduction was 4% lower for 10:1 CPG:EPG ratio compared to 20:1 CPG:EPG ratio. Better activity against ivermectin-resistant larvae and the smallest number of cultures without any reduction was also observed for 10:1 ratio.

The recorded clinical symptoms, with coprological, *post-mortem* and infection level findings, confirm that the PGE has a significant impact on the health, welfare and production parameters of sheep. Due to resistance, ivermectin therapy is not effective enough in sheep strongyle control on the examined farm. The tested isolate of *D. flagrans* exhibits biological effect, *in vitro*. It was determined that, in the given circumstances of the coproculture assay, the optimal CPG:EPG ratio is 10:1. Based on the results of the *in vitro* study, isolate *D. flagrans* MUCL 9827 is not considered suitable for biological control of gastrointestinal strongyles of the sheep.

Accepted on Scientific Board on: AS	28 March 2014.
Defended: DE	
Thesis Defence Board: DB	<p>President: _____ Dr Ivan Pavlović, principal research fellow, Institute of Veterinary Medicine of Serbia, Belgrade;</p> <p>Mentor: _____ Dr Vesna Lalošević, full professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad;</p> <p>Member: _____ Dr Simonida Đurić, assistant professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad.</p>

Садржај:

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	5
2.1. Желудачно-цревна стронгилидоза оваца	6
2.1.1. Етиологија	6
2.1.2. Епизоотиологија	8
2.1.3. Клиничка слика	10
2.1.4. Патолошке промене	12
2.1.5. Имунитет	12
2.1.6. Дијагноза	13
2.2. Значај желудачно-цревне стронгилидозе оваца	16
2.3. Контрола желудачно-цревне стронгилидозе оваца	17
2.3.1. Употреба антихелминтика	17
2.3.2. Примена система напасања	20
2.3.3. Остале методе контроле	22
2.3.3.1. Примена нематофагних гљива	23
2.3.3.1.1. <i>Duddingtonia flagrans</i>	23
2.3.3.1.1.1. Историјат, порекло и распрострањеност	23
2.3.3.1.1.2. Морфологија и особине	27
2.3.3.1.1.3. Утицај на околину	29
2.3.3.1.1.4. Примена <i>D. flagrans</i>	29
2.3.3.1.1.5. Дозно-зависни ефекат <i>D. flagrans</i> приликом примене код оваца	30
2.3.3.2. Примена вакцина	31
3. НАУЧНА ХИПОТЕЗА И ЦИЉ РАДА	32
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	34
4.1. ПАРАЗИТОЛОШКА ИСПИТИВАЊА ОВАЦА	35
4.1.1. Место експерименталног истраживања и подаци о животињама	35
4.1.1.1. Подаци о климатским параметрима	35
4.1.1.2. Подаци о фарми и животињама	35
4.1.2. Клинички преглед оваца	36
4.1.2.1. Примена FАMАСНА© дијаграма у процени анемије	36
4.1.3. Паразитолошки преглед	38
4.1.3.1. Бројање паразитских елемената у измету оваца	38
4.1.3.2. Постављање копрокултуре и идентификација инфективних ларвица	40
4.1.3.3. Налаз и идентификација одраслих паразита добијених <i>post mortem</i>	42
4.1.4. Утврђивање сезонске динамике и интензитета инвазије желудачно-цревних стронгилида	44
4.2. КОНСТРУКЦИЈА АМА ЗА СКУПЉАЊЕ ИЗМЕТА ОВАЦА	45
4.3. УТВРЂИВАЊЕ ПРИСУСТВА РЕЗИСТЕНЦИЈЕ НА ИВЕРМЕКТИН	45
4.3.1. Почетна испитивања ефикасности ивермектина против желудачно-цревних стронгилида урађена 2012. године	45
4.3.2. Испитивање ефикасности ивермектина против желудачно-цревних стронгилида током 2013. године	47
4.3.2.1. Испитивање ефикасности ивермектина против <i>Nematodirus</i> spp.	47
4.3.2.2. Испитивање ефикасности ивермектина против осталих стронгилида	48

4.3.3. Испитивање ефикасности ивермектина против желудачно-цревних стронгилида током 2015. године	50
4.3.3.1. Мај 2015. године	50
4.3.3.2. Октобар 2015. године	51
4.4. ИСПИТИВАЊЕ ОСОБИНА НЕМАТОФАГНЕ ГЉИВЕ <i>DUDDINGTONIA FLAGRANS</i> MUCL 9278	52
4.4.1. Изолат <i>Duddingtonia flagrans</i> коришћен у огледима	52
4.4.2. Испитивање морфолошких карактеристика изолата <i>D. flagrans</i> MUCL 9278	53
4.4.3. Умножавање културе гљиве на хранљивим подлогама	53
4.4.3.1. Раст на кромпировом агару	53
4.4.3.2. Раст на гладном агару	55
4.5. ИСПИТИВАЊЕ <i>IN VITRO</i> ЕФЕКТА ИЗОЛАТА <i>D. FLAGRANS</i> MUCL 9278 НА ЖЕЛУДАЧНО-ЦРЕВНЕ СТРОНГИЛИДЕ ОВАЦА	56
4.5.1. Припрема суспензије гљиве и инфективних ларвица	56
4.5.1.1. Припрема радне суспензије гљиве	56
4.5.1.2. Припрема радне суспензије инфективних ларвица	57
4.5.2. <i>In vitro</i> провера нематофагне активности изолата <i>Duddingtonia flagrans</i> MUCL 9827 на ларвице желудачно-цревних стронгилида оваца	58
4.5.2.1. Хламидоспоре и ларвице помешане одмах	58
4.5.2.2. Ларвице додате 4 дана након хламидоспора	59
4.5.2.3. Ларвице додате у културу мицелијума стару 7 дана	59
4.5.3. Тест копрокултуре - ефекат <i>D. flagrans</i> посматран кроз однос ХПГ:ЈПГ	59
4.5.3.1. Избор експерименталних животиња	59
4.5.3.2. Утврђивање одсуства нематофагних гљива у огледним животињама	60
4.5.3.3. Избор односа ХПГ:ЈПГ и постављање огледа	60
4.5.3.4. Израчунавање процента развоја и процента редукције ларви	62
5. РЕЗУЛТАТИ	64
5.1. КЛИМАТСКИ ПАРАМЕТРИ И ИСТОРИЈА ДЕХЕЛМИНТИЗАЦИЈЕ	65
5.2. НАЛАЗИ ПАРАЗИТОЛОШКИХ ИСПИТИВАЊА ОВАЦА	67
5.2.1. Налази клиничког прегледа оваца	67
5.2.1.1. Клиничка манифестација паразитског гастроентеритиса оваца	67
5.2.1.2. Резултати примене FAMACHA® дијаграма у процени анемије	70
5.2.2. Налази морфолошког испитивања развојних облика желудачно-цревних стронгилида	74
5.2.2.1. Идентификација инфективних ларвица	74
5.2.2.2. Идентификација одраслих паразита и налаз <i>post mortem</i> прегледа органа	76
5.2.3. Сезонска динамика и интензитет инвазије желудачно-цревних стронгилида	83
5.3. ИЗГЛЕД АМА ЗА СКУПЉАЊЕ ИЗМЕТА ОВАЦА	88
5.4. ИСПИТИВАЊЕ ЕФИКАСНОСТИ ИВЕРМЕКТИНА	90
5.4.1. Резултати почетних испитивања ефикасности ивермектина урађених 2012. године	90
5.4.2. Ефикасност ивермектина против желудачно-цревних стронгилида у испитивањима током 2013. године	93
5.4.2.1. Ефикасност ивермектина против <i>Nematodirus</i> spp.	93
5.4.2.2. Ефикасност ивермектина против осталих стронгилида	93
5.4.3. Ефикасност ивермектина против желудачно-цревних стронгилида у испитивањима током 2015. године	94
5.4.3.1. Мај 2015. године	94
5.4.3.2. Октобар 2015. године	96
5.5. КАРАКТЕРИСТИКЕ НЕМАТОФАГНЕ ГЉИВЕ <i>DUDDINGTONIA FLAGRANS</i> MUCL 9827	97

5.5.1. Морфологија различитих структура гљиве	98
5.5.2. Раст на хранљивим подлогама	100
5.5.2.1. Раст на кромпировом агару	100
5.5.2.2. Раст на гладном агару	103
5.5.3. Нематофагна активност изолата <i>D. flagrans</i> MUCL 9827	105
5.6. ИСПИТИВАЊЕ <i>IN VITRO</i> ЕФЕКТА ИЗОЛАТА <i>D. FLAGRANS</i> MUCL 9278 НА ЖЕЛУДАЧНО-ЦРЕВНЕ СТРОНГИЛИДЕ ОВАЦА	106
5.6.1. <i>In vitro</i> утицај нематофагне активности изолата нематофагне гљиве <i>Duddingtonia flagrans</i> MUCL 9827 на ларвице желудачно-цревних стронгилида оваца	106
5.6.2. Тест копрокултуре- ефекат <i>D. flagrans</i> посматран кроз однос ХПГ:ЈПГ	112
5.6.2.1. Налаз нематофагних гљива пре извођења огледа	112
5.6.2.2. Дозно зависни ефекат гљиве на редукцију броја ларвица <i>in vitro</i>	112
6. ДИСКУСИЈА	117
6.1. Налази паразитолошких испитивања оваца	118
6.2. Ефикасност ивермектина	127
6.2.1. Ефикасност против стронгилида	127
6.2.2. Ефикасност против <i>Nematodirus</i> spp.	134
6.3. Карактеристике нематофагне гљиве <i>Duddingtonia flagrans</i> MUCL 9827	139
6.4. Испитивање <i>in vitro</i> ефекта изолата <i>D. flagrans</i> MUCL 9278 на желудачно-цревне стронгилиде оваца	142
6.5. Коментари свеукупног налаза дисертације	151
7. ЗАКЉУЧАК	154
8. ЛИТЕРАТУРА	157
БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ	186

**Дисертација је урађена у оквиру пројекта Министарства просвете,
науке и технолошког развоја Републике Србије бр. ТР 31027 под називом
„Органска пољопривреда: унапређење производње применом ђубрива,
биопрепарата и биолошких мера“**

1. УВОД

Добро је позната чињеница да (домаћи) преживари, а поготову овце, представљају веома важан извор анималних протеина (меса и млека) за исхрану људи у многим земљама широм света (Nwosu и сар, 2007). Поред примарне улоге као извора хране за људе, значај узгоја оваца се може сагледати кроз секундарне (развој прерађивачке индустрије и утицај на ланце снабдевања) али и многобројне терцијарне улоге (у транспорту, изградњи, социо-културалном утицају на руралне заједнице, очувању равнотеже околине и естетике крајолика, сигурности у производњи хране, лову, туризму, заштити од пожара у шумским пределима итд.). Наведене улоге имају велики значај за одржавање мултифункционалности пољопривредних газдинстава што је посебно важно у удаљеним пределима где је узгој оваца (и коза) често последња могућа активност (Calatrava и Sayadi, 2002; De Rancourt и сар, 2006). Осим овога, важно је истаћи да су овце, као и остали преживари, у стању да користе ресурсе у слабо плодним, маргиналним пределима који нису погодни за пољопривреду (због способности да пасу близу тла, конзумирају дрвенасте биљке, ниских захтева за водом) што доприноси очувању плодних површина за производњу хране биљног порекла за људе којима недостаје све више хране на глобалном нивоу (De Rancourt и сар, 2006; Eisler и сар, 2014).

Овчарство је четврта по значају грана сточарске производње у Републици Србији. Производња је сконцентрисана у брдско-планинским подручјима где постоји више могућности за коришћење испаше, у највећем обиму у Шумадији и западној Србији (*карта 1*), где се на газдинствима узгаја чак 60% свих грла оваца (Поповић, 2014). Ако се посматра овчарство Србије током неколико деценија, постоје периоди наизменичног повећавања и смањивања броја оваца. Први карактерише раст укупне популације оваца, у периоду после Другог светског рата где је број оваца у Србији са 4,38 милиона (1947) достигао свој максимум почетком 50-их година када је било и 5,17 милиона оваца (1954). Од тада је број животиња прогресивно опадао до 2002. године, када је забележен историјски минимум са нешто више од 1,44 милиона грла (РЗС, 2008). Последњих година број оваца, уз мање осцилације, поново полако расте где је укупна популација оваца у Србији, према најновијим подацима, процењена на преко 1,78 милиона грла (РЗС, 2016).

У нашем овчарству постоје системи интензивног, полуинтензивног или екстензивног узгоја, где се животиње држе и хране затворене у стајама и торовима, напасају на пашњацима или се хране комбиновањем ова два начина. Производња вуне скоро да и нема економског значаја, а постоји и тенденција смањивања производње млека (Niżnikowski и сар, 2006). У производњи меса доминирају мала газдинства за производњу јагњаци са употребом испаше и без ње, при чему је основна разлика између поменутих система у коришћењу периода испаше током пашне сезоне (Поповић, 2014).

У регионима са развијеним овчарством основни предуслов економичности исхране оваца је напасање појединих категорија оваца као део програма интензивног узгоја (Симин, 2009; Арсић и Јовановић, 2013). Напасање оваца је економски оправдано због чињенице да овце најрационалније трансформишу траву у беланчевине неопходне за људску исхрану (Вујић и сар, 1980). Међутим, у оваквом систему узгоја, практично је немогуће избећи инвазије различитим врстама хелмината којима су пашњаци контаминирани (Вујић и сар, 1980). При томе, инвазија желудачно-цревним нематодама (стронгилидама) спада у групу најважнијих обољења која представљају лимитирајући фактор у интензивном овчарству широм света, првенствено због економских губитака до којих доводи, као и због специфичности које носе различити начини за њену контролу (Вујић и сар, 1980; Симин, 2009; West и сар, 2009; Scott, 2013).

Карта 1. Заступљеност узгоја оваца и коза у Србији по општинама (Поповић, 2014).

Сузбијање паразитских болести оваца је засновано на низу мера које укључују контролисано напасање, посебне режиме исхране и узгоја, примену антипаразитета и биолошку контролу. Од побројаних начина за контролу пашних хелминтоза, примена

антихелминтика је најлакша, најефикаснија и најјефтинија мера и стога се најчешће се спроводила у прошлости, са тенденцијом да тако и остане (Цветковић, 1976). Међутим, терапија синтетским антихелминтицима постаје све мање ефикасна, због развоја резистенције желудачно-цревних стронгилида на њихово дејство. Резистенција је веома раширена на глобалном нивоу, и присутна је у свим класама антихелминтика које се употребљавају у терапији и превентиви паразитског гастроентеритиса, уз чест налаз мултирезистентних изолата (Kaplan, 2004; Papadopoulos и сар, 2012; Scott, 2013; Rose и сар, 2015). Акумулација резистентних стронгилида које угрожавају живот, здравље, продуктивност и добробит животиња је најважнији проблем савременог овчарства због немогућности ефикасне терапије (и профилаксе) када се она заснива само на употреби антихелминтика. Управо због тога постоји тзв. интегрисани систем контроле паразитског гастроентеритиса где се ефикасна контрола постиже комбинацијом различитих мера сузбијања (Waller, 1999).

Једна од (биолошких) мера контроле која посебно обећава је примена нематофагних гљива да би се контаминација пашњака свела на минимум. Нематофагне гљиве се могу наћи у земљишту живећи углавном као сапрофити на мртој органској материји користећи слободноживеће нематодe као главни или додатни извор хране (Симин, 2009). Врста која је била предмет истраживања од почетка 90-их година прошлог века, а која је још увек у фокусу, је *Duddingtonia flagrans* (Симин, 2009). Због способности да преживи пасажу кроз дигестивни тракт животиња и да после расте у измету и испољава предаторске активности против ларвица желудачно-цревних стронгилида које се развијају, ова гљива се користи за смањивање инфективности пашњака што последично резултира смањењем укупног броја паразита у животињама, до нивоа кад ће бити спречени и клинички и супклинички паразитизам.

Од свих врста домаћих преживара у Србији овце се највише напасају. На пашњацима има преко 420.000 грла (24,3% од укупног броја оваца у земљи) од којих је нешто преко 132.000 само у Војводини (48,8% од укупног броја оваца у покрајини) (РЗС, 2013). Мноштво животиња на паши значи и редовну употребу антихелминтика; међутим података о резистенцији нема.

Узимајући у обзир наведене чињенице, потреба провере ефикасности лекова и проналажења алтернативног начина за контролу паразитског гастроентеритиса оваца у нашим производним условима се сама намеће.

Примена нематофагних гљива је актуелан начин борбе против стронгилидозе оваца. Сврха овог истраживања је утврђивање *in vitro* ефекта једног од изолата *Duddingtonia flagrans* на желудачно-цревне стронгилиде оваца ради упознавања његових биолошких особина и потенцијала нематофагне активности. Испитивање посебног начина дозирања ће допринети развоју сопственог протокола примене гљиве код оваца у условима природне инфекције, а стечена знања би омогућила смањивање контаминације пашњака што на крају треба да резултира умањењем губитака, рационалнијом употребом антихелминтика и смањењем њихових резидуа у месу оваца што је у складу са захтевима потрошача.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Желудачно-цревна стронгилидоза оваца

2.1.1. Етиологија

Trichostrongylidosis et strongylosis ventriculi et intestini ovium односно желудачно-цревну стронгилидозу или паразитски гастроентеритис (ПГЕ) карактеришу сви органски и функционални поремећаји сиришта и црева оваца које изазивају ларвени и одрасли облици нематода из родова *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Teladorsagia*, *Ostertagia*, *Nematodirus*, *Bunostomum*, *Cooperia*, *Oesophagostomum* и *Chabertia*. То су паразити црвенкасте, жућкастосмеђе или беличасте боје, различите дужине која варира у зависности од врсте и пола (женка углавном увек већа од мужјака) и креће се од 4-4,5 mm (мужјак *Trichostrongylus axei*) до 34 mm (женка *Haemonchus contortus*) (Симин, 2009). Према таксономској класификацији, узрочници стронгилидозе спадају у ред **Strongylida** (коло *Nematoda*) по чему је болест и добила име. Већина врста које изазивају обољење спада у надфамилију *Trichostrongyloidea*, а мање у друге надфамилије, *Strongyloidea* (*Oesophagostomum* spp. и *Chabertia* sp.) и *Ancylostomatoidea* (*Bunostomum* sp.). Уз набројане родове, уобичајен је налаз нематода из рода *Strongyloides* који таксономски спада у ред *Rhabditida*, и рода *Trichuris*, део класе *Adenophorea*, који паразитирају на истим местима где и желудачно-цревне стронгиле, па се веома често помињу уз ове узрочнике.

У домаћину се стронгиле налазе у сиришту, танким или у дебелим цревима, а врсте се разликују и по патогености и деле на високо, умерено и ниско патогене (Abbott и сар, 2009), што је приказано у Табели 1. Патогеност је у многоне условљена врстом и бројем паразита у животињама, па су све врсте потенцијални патогени у случају присуства велике популације, али зависи и од пријемчивости домаћина.

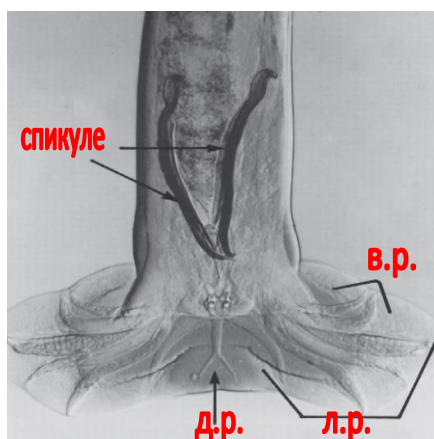
Табела 1. Таксономска класификација најважнијих врста желудачно-цревних стронгилада оваца. Црвеном бојом приказани ред по коме ове група паразита оваца носи назив и фамилија која броји највише врста. Подела у односу на патогеност на високо (В), умерено (У) и ниско (Н) патогене урађена по Abbott-у и сарадницима (2009) и Beveridge-у и сарадницима (1985)*. Слова С, Т и Д означавају место паразитирања: сириште, танка и дебела црева, тим редом.

Таксономска категорија - латински	Таксономска категорија - српски	Назив таксона
<i>Regnum</i>	Царство	<i>Animalia</i>
<i>Phylum</i>	Коло	<i>Nematoda</i>
<i>Classis</i>	Класа	<i>Secernentea</i>
<i>Ordo</i>	Ред	Strongylida
<i>Superfamilia</i>	Надфамилија	<i>Ancylostomatoidea</i>
<i>Familia</i>	Фамилија	<i>Ancylostomatidae</i>
<i>Genus</i>	Род	<i>Bunostomum</i>
<i>Species</i>	Врста	<u><i>B. trigonocephalum</i></u> (Т, У)
<i>Superfamilia</i>	Надфамилија	<i>Diaphanocephaloidea</i>
<i>Superfamilia</i>	Надфамилија	<i>Metastrongyloidea</i>
<i>Superfamilia</i>	Надфамилија	<i>Strongyloidea</i>
<i>Familia</i>	Фамилија	<i>Chabertiidae</i>
<i>Genus</i>	Род	<i>Chabertia</i>
<i>Species</i>	Врста	<u><i>C. ovin</i></u> (Д, Н)
<i>Genus</i>	Род	<i>Oesophagostomum</i>

Таксономска категорија - латински	Таксономска категорија - српски	Назив таксона
<i>Species</i>	Врста	<i>O. columbianum</i> (Д, -)
<i>Species</i>	Врста	<i>O. venulosum</i> (Д, Н)
<i>Superfamilia</i>	Надфамилија	<i>Trichostrongyloidea</i>
<i>Familia</i>	Фамилија	<i>Trichostrongylidae</i>
<i>Genus</i>	Род	<i>Haemonchus</i>
<i>Species</i>	Врста	<i>H. contortus</i> (С, В)
<i>Genus</i>	Род	<i>Teladorsagia</i>
<i>Species</i>	Врста	<i>T. circumcincta</i> (С, В)
<i>Genus</i>	Род	<i>Trichostrongylus</i>
<i>Species</i>	Врста	<i>T. axei</i> (С, У)
<i>Species</i>	Врста	<i>T. colubriformis</i> (Т, У)
<i>Species</i>	Врста	<i>T. vitrinus</i> (Т, У)
<i>Genus</i>	Род	<i>Cooperia</i>
<i>Species</i>	Врста	<i>C. curticei</i> (Т, Н)
<i>Species</i>	Врста	<i>C. pectinata</i> (Т, -)
<i>Species</i>	Врста	<i>C. punctata</i> (Т, -)
<i>Familia</i>	Фамилија	<i>Molineidae</i>
<i>Genus</i>	Род	<i>Nematodirus</i>
<i>Species</i>	Врста	<i>N. abnormalis</i> (Т, У)*
<i>Species</i>	Врста	<i>N. battus</i> (Т, В)
<i>Species</i>	Врста	<i>N. filicollis</i> (Т, Н)
<i>Species</i>	Врста	<i>N. spathiger</i> (Т, У)

Извор за таксономску класификацију: http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=12408.

Желудачно-цревне стронгилиде имају типичну грађу тела са простим системима органа као и све друге нематоде, и одвојених су полова (Taylor и сар, 2007; Bowmann, 2009; Sutherland и Scott, 2010). Морфолошка карактеристика од значаја за дисертацију је свакако грађа копулаторне бурзе мужјака, на основу које се врши морфолошко диференцирање врста према изгледу и величини режњева копулаторне бурзе (дорзални, вентрални и латерални), спикула и губернакулума (слика 1).



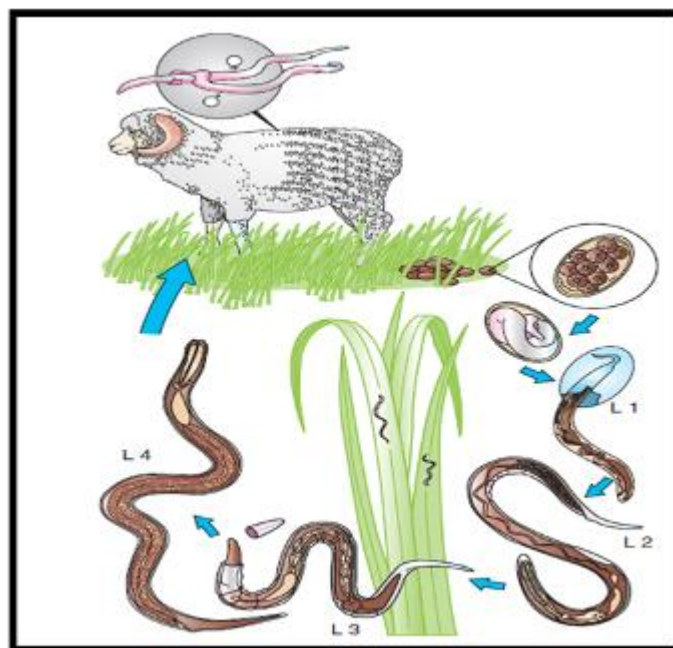
Слика 1. Изглед копулаторне бурзе мужјака по Bowmann-у (2009).

в.р.- вентрални режањ
д.р. - дорзални режањ
л.р. – латерални режањ

2.1.2. Епизоотиологија

Циклус развоја желудачно цревних стронгилида је директан, без прелазних домаћина, и исти је код већине врста (слика 2). Овце се заразе пероралним уношењем инфективних ларвица (ларвице трећег стадијума- L_3) које се налазе на влатима траве на пашњаку или миграцијом L_3 ларви кроз кожу или слузнице (перкутано), као што је случај код *Strongyloides papillosus* чије филариформне ларве пробијају кожу интердигиталних простора папака оваца (Симин, 2009). Када доспе у дигестивни тракт, L_3 инвадира слузницу и после извесног времена мировања се пресвлади и преобраћа у ларву 4. стадијума (L_4). Током развоја и пресвладчења ларве се хране и расту оштећујући слузницу, изазивајући запаљење, крварење и испуштајући токсичне продукте метаболизма у организам домаћина у чему се огледа њихово патогено дејство. Одрасли паразити, који се развијају из последњег ларвеног стадијума L_5 , копулирају када достигну полну зрелост, а женка полаже јаја у дигестивни тракт овце која изметом доспевају у спољашњу средину (Симин, 2009). Време потребно за сазревање паразита и почетак полагања јаја (препатентни период) код већине врста износи 2-4 недеље (Taylor и сар, 2007). Желудачно-цревне стронгиледе су овипарне тј. полажу несегментирана јаја, осим женки *Strongyloides papillosus* која је оовивипарна што значи да полаже јаја са развијеном ларвом првог стадијума- L_1 (Симин, 2009). У спољашњој средини под оптималним еколошким условима јаја ембрионирају и из њих излазе L_1 ларвице које се хране бактеријама и пресвладче се у наредни L_2 стадијум. Ови слободноживећи облици су веома осетљиви на неповољне услове на пашњаку, поготово на исушивање и УВ зрачење, јер немају заштитни омотач попут инфективног стадијума захваљујући коме L_3 имају способност дугог преживљавања на пашњаку, чак у неповољним условима. Инфективне ларвице су негативно геотропне и мигрирају вертикално по трави када има довољно влаге на влатима, постају доступне за ингестију и циклус се затвара (Bowmann, 2009).

Слика 2. Циклус развоја желудачно-цревних стронгилида (по Bowmann-у (2009))



Код *Nematodirus* врста, циклус се разликује због тога што се развој инфективних ларвица одвија у јајима, па су оне додатно заштићене од неповољних услова спољашње

средине. Поред тога, неким врстама (*N. battus*, *N. filicollis*) је потребан период хлађења јаја да би ларвице изашле (Van Dijk и Morgan, 2009).

Ради успешног и целовитог програма контроле стронгилида потребно је познавање утицаја спољашње средине на слободноживеће стадијуме. Њихов развој је условљен факторима попут температуре, влаге, сунчева светлости и кисеоника (Шибалић и Цветковић, 1996). Температура и влага одређују успех и брзину развоја тако да се део циклуса развоја стронгилида у спољној средини може поделити на развој до инфективне ларве и преживљавање и миграцију ларве. Услови за ембрионирање јаја у погледу спољне температуре се разликују за поједине врсте. Највећи степен толеранције према ниским температурама има *T. circumcinta* и *Nematodirus* врсте, па *T. colubriformis* и најмање *H. contortus* (Van Dijk и Morgan, 2009; Sutherland и Scott, 2010). Минимална температура излегања јаја *T. circumcinta* са једне и *H. contortus*, *T. axei*, и *T. vitrinus* са друге стране је 4°C и 9°C, тим редом, док је оптимална између 23°C и 28°C (O'Connor и сар, 2006).

Отпорност према ниским температурама постоји и у оквиру различитих стадијума једне врсте. Како је поменуто, нижи онтогенетски стадијуми су осетљивији од ЛЗ. На пример, неембрионирана јаја *T. colubriformis* слабије подносе ниске температуре (од 4°C) него ембрионирана, преинфективне ларве преживљавају слично дуго док је велики проценат инфективних ларви преживео чак и више од 312 дана на истој температури (O'Connor и сар, 2006). Слично, неембрионирана јаја *H. contortus* преживе око недељу дана на 4°C (Sutherland и Scott, 2010), док је на сличној температури од 5°C забележено преживљавање ларвица дуже од 550 дана (Boag и Thomas, 1985). Брзина достизања инфективног стадијума *H. contortus* и *T. colubriformis* на температурама изнад 30 и 35 °C износи свега 2-3 дана, на оптималној температури од 20–25°C износи 4-6 дана, а на температури од 10°C око 2 недеље. Слично је и код *T. circumcinta* где је на 25°C излегање било само 1 дан а најдуже на 5°C (око 12 дана), док је развој до ЛЗ најбржи на 30°C и то 5 дана, најспорији на 10°C (око 19 дана) а није га ни било на 5 односно 35°C (O'Connor и сар, 2006). Код *Nematodirus* spp. у било којој посматраној температури степен развоја је спорији него у осталих врста желудачно-цревних стронгилида (Bailey и сар, 2009; Van Dijk и Morgan, 2009).

Поред температуре, присуство довољног нивоа влаге је потребно за успешно ембрионирање, излегање јаја и развој до ЛЗ стадијума, што се разликује у односу на врсту. При константној температури од 23°C, ниво релативне влажности потребне за развој јаја *H. contortus* се кретао између 70-100%, односно 65% и 60% за *T. colubriformis* и *T. circumcinta*, тим редом (Sutherland и Scott, 2010). Минимални садржај влаге код којег се излегао 1% јаја *H. contortus* износи 39%, слично као *T. colubriformis* (35%) тј. нешто више од *T. circumcinta* (25%) (O'Connor et al., 2006). Влажност средине се одржава преко постојеће влаге тла, атмосферских падавина или, у ограниченом степену, преко росе (Шибалић и Цветковић, 1996). У недостатку кише, довољна количина зелене масе смањује евапорацију воде из измета и чува влажност земљишта, која је један од веома важних фактора који утиче на успешност развоја *H. contortus* и *T. colubriformis* до инфективних ларвица (Khadijah и сар, 2013). Обиље свеже и сочне траве, с друге стране, повећава количину воде у измету и обезбеђује довољан почетни ниво влаге за излагање и развој ларви. Ако се избачени измет нагло осуши, на његовој површини се образује покорица кроз коју је отежан продор кисеоника па многа јаја пропадају још пре ембрионирања. Јаја могу остати у латентном стању и до 6 недеља у сувом измету ако се ембрионирање заврши пре исушивања, а ларвице излазе у року од неколико минута после влажења материјала (O'Connor et al., 2006).

У спољној средини, ЛЗ су много отпорније на екстремне температуре и исушивање због заштитног омотача и способности да се акумулирају у окружење много повољније микроклиме, односно земљиште (Sutherland и Scott, 2010). Недавни резултати студије немачких научника су показали да је земљиште веома важан резервоар ЛЗ и да их ту има много више него на биљкама (Knapp-Lawitzke и сар, 2014; 2016). Висина биљног покривача је фактор који утиче на дужину преживљавања ЛЗ (Sutherland и Scott, 2010). Осим тога, и биљни састав утиче на преживљавање ЛЗ, којих има више на пашњацима са већим процентом легуминоза (Knapp-Lawitzke и сар, 2014). Највећи број ларвица се налази на биљкама у доба дана са оптималном влагом, температуром и сунчевом светлошћу, односно рано ујутру и увече током лета, а више око средине дана у рано пролеће и касну јесен. Тако чим почне исушење услед јаког сунца које изазива смрт ларви због велике топлоте и УВ зрачења (Van Dijk и сар, 2009) или наступе ниске температуре, оне се враћају према корену биљке па улазе и у саму земљу и преживљавају неповољан утицај фактора спољне средине. Дужина преживљавања ЛЗ је проверена у *in vitro* студији, где су на високим температурама од 30°C најкраће преживљавале *Nematodirus* врсте (4-8 недеља), *H. contortus* и *T.colubriformis* око 3 месеца а *T.circumcinta* 5 месеци, а на ниским од 5°C око 500 дана (Boag и Thomas, 1985). Насупрот овоме, Morgan и Van Dijk (2012) говоре о много краћем преживљавању ЛЗ на вишим температурама до ког долази због повећања метаболизма услед активности, док је ларва онемогућена да се храни због присуства заштитног омотача. Према тим подацима, ЛЗ *H. contortus* преживљавају исто 3 месеца али на 12°C, док је на 28°C тај период само 9 дана. У условима на пашњаку, дужина преживљавања ЛЗ се разликује у односу на годишње доба. Познато је да у условима умерене климе, где су зиме релативно оштре, најбоље презимљава *T. circumcinta* отпорна на хладноћу, преживљавају *Trichostrongylus* и *Nematodirus* spp., али не и *H. contortus* који је адаптиран на тропске климате (Sutherland и Scott, 2010; Falzon и сар, 2014). Стратегија презимљавања неповољних услова у тим климатима је за *H. contortus* улазак у хипобиозу (Morgan и Van Dijk, 2012). Хипобиоза је феномен застоја у развоју нематода где се циклус заустави у раном Л4 стадијуму (ЕЛ4) услед дејства имунитета, неповољних услова спољашње средине и величине популације ингестираних ЛЗ. До реактивације ларвица долази услед хормоналних стимулуса или промене имуног статуса, који у одраслих оваца настаје у периоду око јагњења („periparturient relaxation of immunity (PPRI)). Пошто се овце, као сезонски полно активне животиње, јагње у пролеће, дефинисан је феномен пролећног повећања броја јаја („spring rise“) који је последица PPRI (Шибалић и Цветковић, 1996; Sutherland и Scott, 2010). Уз пролећно повећање, презимеле ларве доприносе броју (и врстама) слободноживећих стадијума желудачно-цревних стронгилида на пашњаку, које су расположиве за инвадирање различитих категорија оваца. Из свега наведеног се јасно види да је добро познавање сложених епизоотиолошких образаца пресудно за адекватну контролу паразитског гастроентеритиса оваца.

2.1.3. Клиничка слика

С обзиром на различите ситуације које утичу на однос домаћин-паразит, паразитски гастроентеритису може бити асимптоматски (супклинички) или праћен клиничким знацима (Симин, 2009). Појава клиничких симптома и њихов интензитет зависе од врсте и броја паразита, старости животиње, исхране и других спољашних и унутрашњих чинилаца који могу утицати на физиолошко стање и кондицију животиња (Катић и сар, 1967; Шибалић и

Цветковић, 1996). Општа карактеристика стронгилидозе је прогресиван губитак кондиције на нивоу целог стада, уз варијације код појединачних животиња. Најтежа клиничка слика се виђа код јагњади која још немају развијен имунитет, мада могу оболети и одрасле овце. Различити клинички симптоми паразитског гастроентеритиса, у које се убрајају заостајање у расту, губитак тежине, пролив, анемија, слабост и понекад изненадно угинуће, и појављују се заједно или појединачно у зависности од тога која врста преовлађује (Катић и сар, 1967).

Тако је код хемонхозе анемија најважнији симптом, чији степен зависи од броја паразита у домаћину. Пролива нема, него је измет сувљи и тврђи што може довести до опстипације (Катић и сар, 1967). Неспецифични симптоми подразумевају губитак тежине, слабост и изнуреност (Yadav и сар, 1993). Због анемије повећава се фреквенца срчаног рада и дисања (Цветковић и сар, 1970; Scott, 2013). Када дође до изразите хипопротеинемије појављује се подвлични едем и асцитес, а до угинућа долази у крајњој фази услед тешке анемије (Цветковић и сар, 1970; Yadav и сар, 1993).

Доминантни клинички симптом теладорзагиозе (остертагиозе) је прогресивно мршављење које је праћено интерминентним проливом. Апетит је смањен. Описане су две форме болести, тип 1 и тип 2 (Taylor и сар, 2007). Прва се јавља на паши („летња“ форма), пре свега код јагњади, а друга доминира зими и последица је масовног симултаног изласка хистотрофних форми из гастричних жлезда сиришта (Scott, 2013).

Трихостронгилидоза најчешће протиче асимптоматски, али је у случају великих инвазија способна да изазове обољење. Појављује се лети код младе јагњади и у рану зиму код старије јагњади и шиљежади, мада могу оболети и одрасле овце, посебно када су изложене стресу и потхрањености (Катић и сар, 1967; Bowmann, 2009; Scott, 2013). Праћена је губитком тежине и тамно-зеленим до црним хроничним проливом уз присуство слузи у најтеже погођених јединки. Перианална регија и задњи екстремитети су упрљани изметом. Друге овце у стаду које немају изражену дијареју су слабије телесне кондиције (Scott, 2013). Анемија је забележена код експерименталних инфекција јагњади са *T. axei* (Gibson, 1954), али није симптом који карактерише трихостронгилидозу.

Нематодироза је пре свега болест јагњади због које су пријемчивија категорија од одраслих оваца. У неким земљама попут Велике Британије, нематодироза јагњади у касно пролеће/рано лето је посебан проблем јер је узрочник веома патогена врста *N. battus*, која је код нас забележена само спорадично у околини Смедерева (Лепојев, 1963). Као и у случају доминације претходна два рода, тако и нематодироза изазива профузан пролив праћен смањењем апетита, дехидрацијом, повећаном жеђи и губитком телесне масе (Катић и сар, 1967; Scott, 2013). Може да дође до угинућа мањег процента оболеле јагњади (Scott, 2013), али је већи проблем дужи период опоравка који често није потпун, што је забележено на неким теренима у Србији (Вујић и сар, 1961). Код нас је нарочито велик проблем код јагњади која се напасају са овцама током године.

Остале врсте стронгилида ретко преовлађују у довољном броју да изазову клиничку болест, па неће бити посебно описане. Ипак, њихова улога се не може занемарити јер учествују у настанку и одржавању анемије (*Bunostomum* sp.) или пролива (*Oesophagostomum* и *Chabertia*) и доприносе слабљењу организма у мешаним инфекцијама.

2.1.4. Патолошке промене

Патолошке промене појединих органа изазване паразитским гастроентеритисом варирају у зависности од врсте и броја паразита који изазивају обољење и од дужине и тока обољења. У случају хемонхозе, прво се запази анемија при прегледу слузница, а након отварања животиње се може пронаћи едем поткожног ткива, мања или већа количина трансудата у абдомену, перикарду, грудној дупљи (Jabbar и сар, 2013). Приметна је атрофија мускулатуре и паренхиматозних органа и косне сржи (Катић и сар, 1967; Taylor и сар, 2007). Садржај сиришта је испуњен свареном крвљу и слузи уз присуство великог броја лако видљивих паразита, а мукоза је хиперемична, задебљала и прожета је дифузним тачкастим крварењима (Al-Zubaidy и сар, 1987).

У случају теладорзагиозе, промене се описују као хиперпластични гастритис (Aitken, 2007). Слузница је задебљала као последица продирања ларвица у зид органа, и на њој се налазе чворићи чији број зависи од степена инвазије, док се конгестија слизнице и ситна крварења проналазе само у тежим случајевма (Durham и Elliott, 1976; Шибалић и Цветковић, 1996).

Код тешке трихостронгилозе, леш је кахектичан без изражених лезија чак и у танком цреву (Bowman, 2009). Понекад се запажа дифузно запаљење слузокоже сиришта и танког црева, уз хиперимију и едем. Испитивањем цревног садржаја паразити овог рода се лако превиде због веома мале величине. Изражена је атрофија цревних ресица. Ако је хипопротеинемична изражена и дуготрајна, може се пронаћи серозна течност у трбушној дупљи (Катић и сар, 1967).

У цревима јагњаци уинулих од нематодирозе се уочава серо-мукозни садржај у предњим партијама танког црева, са повременим налазом хиперимије и обиљем слузи на мукози дуоденума. У садржају се уочавају паразити у клупку који личе на комадиће памучне вате. Долази до атрофије цревних ресица праћене ћелијском инфилтрацијом слузнице, где су промене највише изражене за *N.battus*, мање за *N.spathiger* и најмање за *N.filicollis* (Taylor и сар, 2007). У наших јагњаци нађена су многобројна тачкаста крварења и понекада „катаралне масе сличне гноју“ (Петровић и сар, 1960)

2.1.5. Имунитет

Код желудачно-цревне стронгилозе оваца имунитет је веома значајан у заштити животиња према реинфекцијама и патогеном деловању паразита (Шибалић и Цветковић, 1996). Коначно избацивање паразита укључује препознавање антигена, индукцију одговарајућег имуног одговора који се остварује дејством специфичних антитела, ефекторних ћелија и продукцијом цитокина алергијског или Т2 типа. Антитела, које секретују плазма ћелије, изолована из супернатанта лимфоцита добијених из лимфних чворова који дренирају место инфекције, су употребљена за идентификацију антигена паразита названог HcSL3. Утврђено је да се он налази на површини Л3 ларве *H. contortus* са којег је изолован, а доказан је и на Л3 *T. circumcincta* и *Trychostrongylus spp.* Л4 такође носе специфичне антигене ових стронгилида, док адулти немају ниједан антиген ларвених стадијума није присутан у одраслих облика, што говори да се антигени који стимулишу имуни одговор разликују у односу на зрелост паразита (Meeusen и сар, 2005). Код старијих оваца уношење инфективних ларвица,

које највише стимулишу стварање и повећање титра антитела захваљујући сталним реинфекцијама на пашњаку, доводи до елиминисања одраслих паразита из сиришта и црева што је названо „self cure“ (самолечење) феномен. „Self cure“ је реакција раног типа преосетљивости и представља имуни одговор на антигене новоунетих инфективних ларвица. Овце постају делимично резистентне на поновну инфекцију, али та отпорност траје кратко време, ако се реинфекције не наставе. Феномен је праћен инфилтрацијом мастоцита и еозинофилних леукоцита у слузници црева (Шибалић и Цветковић, 1996; Meeusen и сар, 2005). Цитокини су медијатори сваког имуног одговора а код хелмитоza показују одређени „алергијски“ или T2 тип који укључује стварање интерлеукина IL-4, IL-5 и IL-13. Цитокини у ткивима дигестивног тракта имају важну улогу у активацији еозинофила који ефикасно убијају паразите, што се највише одвија у слоју слузи у сиришту. Откривени су нови молекули из фамилије галектина названи GAL-15 и GAL-14 које епителне ћелије дигестивног тракта оваца после инфекције ларвицама нематода луче у слуз. Ови молекули за време инфекције имају улогу у јачању молекуларних и/или ћелијских веза између угљоводоничних структура на површини нематода и угљоводоника на еозинофилима, мастоцитима и антителима слузнице дигестивног тракта IgA и IgE класе чиме се поспешује елиминација ларви. Могуће је и да делују на муцине повећавајући вискозност слузи, чинећи да се паразити отежано крећу кроз овакву средину (Meeusen и сар, 2005).

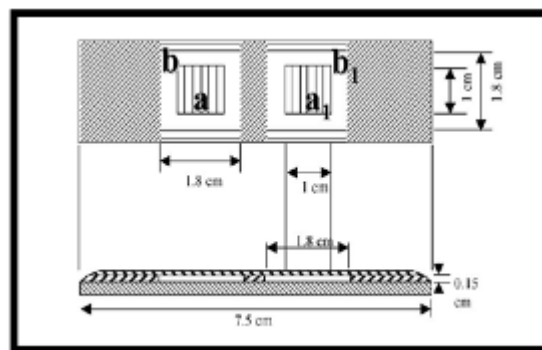
2.1.6. Дијагноза

Дијагноза паразитског гастроентеритиса пре свега почива на познавању епизоотиолошких података за одређено подручје. По Катићу и сарадницима (1967), познавање локалних услова на пашњацима може предвидети и објаснити време и разлоге избијања обољења, те се могу предузети адекватне профилактичне или терапеутске мере. Уз ове податке, историју болести и клиничке симптоме, у много случајева се може поставити прелиминарна дијагноза коју касније ваља потврдити копролошким прегледом. Последњих година је доступан тзв. FAMACHA® (назван по изумитељу из Јужноафричке републике, **F**affa **M**alan **C**HArt) дијаграм који служи за брзу процену клиничке анемије код малих преживара коју изазива *H. contortus* (Malan et al, 2001; van Wyk and Bath, 2002). Метод је заснован на семиквантитативној евалуацији боје очне коњуктиве која се пореди са бојама на оригиналном дијаграму које су у доброј корелацији са одређеним вредностима хематокрита, а оцене се крећу од један до пет и тумаче се на следећи начин: оцена 1=црвена боја, нема анемије; оцена 2=бледо црвена боја, нема анемије; оцена 3=розе боја, умерена анемија; оцена 4=бледо розе боја, анемија; оцена 5=бела боја, тешка анемија (van Wyk and Bath, 2002).

Најчешће се за постављање дијагнозе желудачно-цревне стронгилидозе оваца користи копролошки преглед, који може бити квалитативни и квантитативни. Налаз јаја стронгилида приликом квалитативног копролошког прегледа не даје прецизне податке о степену инвазије и о евентуалним здравственим последицама по домаћина. Стога је неопходно квантификовати јаја, како би се, уз комбинацију о идентификованим родовима/врстама паразита након копрокултуре, могао проценити степен инвазије домаћина (Abbott и сар, 2009).



Слика 3. Изглед McMaster коморице коришћене у истраживањима, ориг.



Слика 4. Детаљан опис димензија и запремине поља McMaster коморице:

$a=0,15$ ml; $a+a_1=0,3$ ml, $b=0,5$ ml; $b+b_1=1$ ml
(по MAFF, 1986; Cringoli et al, 2004)

Такође, квантификација је користан алат за процену контаминације пашњака где се, уз податке о микроклимату, може предвидети и у ком периоду године се очекује већа инфективност пашњака, те благовремено упозорити произвођаче. Постоји неколико метода за бројање јаја стронгилида (Stoll, Wisconsin метод; Катић и сар, 1967; Зајас и Conboy, 2006) које неће бити описане. Златни стандард приликом квантификације паразитских елемената и метода која се најчешће користи је модификована метода по McMaster-у, са различитим нивоима аналитичке осетљивости (MAFF, 1986). McMaster коморица је плочица посебно направљена за квантификацију паразитских елемената (слика 3). Познатих је димензија, а различите нивое аналитичке осетљивости бирамо на основу степена разређења измета (разређује се водом или раствором за флотацију) и површине у пољима која се прегледа (слика 4). Број јаја по граму измета (ЈПГ) се рачуна следећом формулом:

$$\text{ЈПГ} = n (d / v),$$

где је n број јаја која су избројана у испитаној јединици површине (запремине), d је фактор разређења (10, 15, 20, 30, 40, 50); а v представља запремину поља McMaster коморице која је прегледана (0,15; 0,3; 0,5 или 1 ml).

Поред ове методе за бројање, постоје и нове које се зову FLOTAC и MINI-FLOTAC. Италијански паразитолог Ђузепе Кринголи (Giuseppe Cringoli) је првобитно осмислио FLOTAC технику за квантификацију паразитских елемената, аналитичке осетљивости 1-2 јпг (Cringoli и сар, 2010). Како каже сам аутор (Cringoli и сар, 2013), MINI-FLOTAC је логичан следбеник FLOTAC технике, осмишљен за извођење обимних истраживања у слабије опремљеним лабораторијама (где нема посебне центрифуге за FLOTAC апарат, и друге опреме). MINI-FLOTAC је посебно дизајниран за епидемиолошка истраживања и надзор где се велики број узорака измета мора прегледати за кратко време. То је систем за квантификацију паразитских елемената који се састоји из два дела – базе и диска за читавање резултата. Препорука изумитеља је да се диск комбинује са уређајем за узорковањем названим FILL-FLOTAC, који се састоји из контејнера, колектора и филтера.



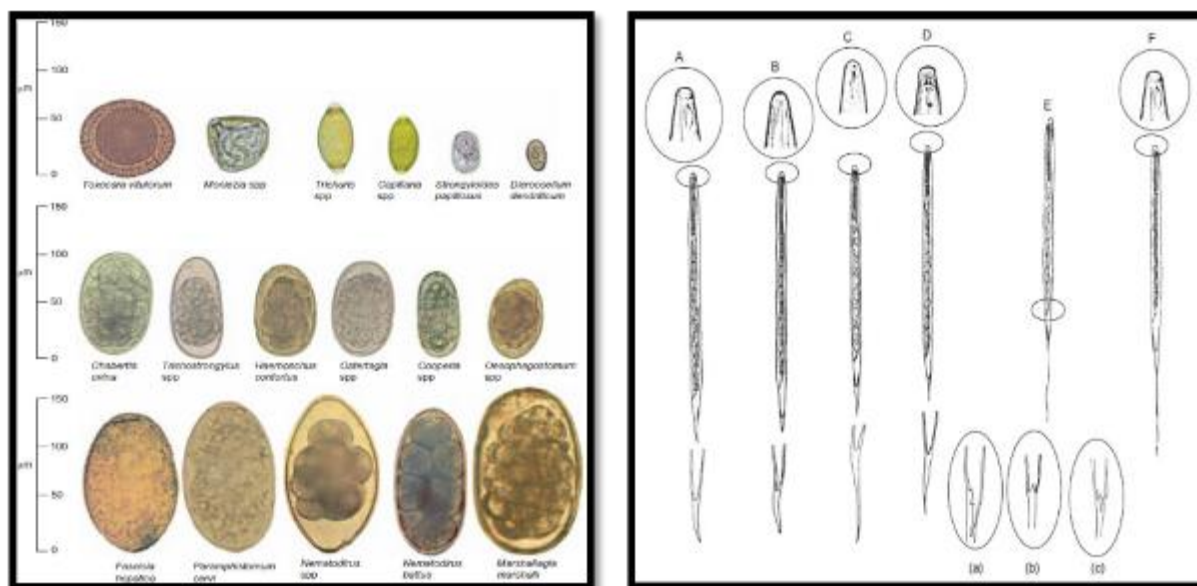
Слика 5. Изглед MINI-FLOTAC апарата и FILL-FLOTAC уређаја, ориг.

Предност прегледања узорка MINI-FLOTAC уређајем је та што је због прегледања веће запремине узорка (2 мл) повећана и аналитичка осетљивост што резултира прецизнијим налазом који је важан нарочито код испитивања ефикасности антипаразитета.

Јаја неких нематода оваца, као на пример *Strongyloides papillosus*, *Trichuris* spp., *Nematodirus* spp. и *Marshallagia* spp., се лако препознају приликом лабораторијског прегледа, јер морфолошки разликују једна од других као и од јаја осталих врста желудачно-цревних стронгилида (Taylor и сар, 2007). Међутим, да би се идентификовала јаја осталих врста желудачно-цревних стронгилида чија је морфологија и морфометрија веома слична, потребно је урадити прецизна мерења њихових димензија које уз податке о морфологији моруле могу помоћи у идентификацији рода и/или врсте (Thienpont, 1979). Ипак, у пракси се најчешће ова дуготрајна и непоуздана процедура не спроводи, него се ради култивација измета (поставља се тзв. копрокултура) да би се добиле инфективне ларвице које се морфолошки лакше разликују и препознају уз помоћ бројних кључева за идентификацију (MAFF, 1986; Taylor и сар, 2007; Zajac и Conboy, 2006; van Wyk и сар, 2004; van Wyk и Mayhew, 2013).

Иако је метода идентификације ларвица углавном поуздана, постоје примери да је правилна морфолошко-морфометријска дијагноза у супротности са резултатима ДНК тестирања (нпр. Waghorn и сар, 2014). Молекуларне методе дијагностике последњих година све више налазе примену у дијагностици желудачно-цревне стронгилидозе оваца, пре свега због своје прецизности и брзине дијагностике (Roeber и сар, 2011; Burgess и сар, 2012; McNally и сар, 2013). Може се користити и мерење нивоа пепсиногена у крви као индикатора оштећења слузнице сиршита паразитом *T.circumcincta* (Taylor и сар, 2007).

Један од најпоузданијих метода за утврђивање узрочника паразитског код пашних оваца јесте препознавање врста желудачно-цревних стронгилида на основу морфологије паразита добијених након обраде органа дигестивног тракта у којима они паразитирају (Катић и сар, 1967). Могу се идентификовати одрасли паразити (при чему се најчешће идентификују мужјаци на основу морфологије копулаторне бурзе и спикула) и/или незрели паразити добијени дигестијом остругане слузнице одговарајућег дела дигестивног тракта (MAFF, 1986; Taylor и сар, 2007).



Слика 6. Морфологија јаја хелмината оваца (лево) и ларвица желудачно-цревних стронгилида (десно), по Taylor-у и сарадницима (2007).

2.2. Значај желудачно-цревне стронгилидозе оваца

Значај желудачно-цревне стронгилидозе оваца се може сагледати, прво, са аспекта здравља и добробити животиња, и друго, са економског аспекта. Инвазија оваца гастроинтестиналним паразитима проузрокује директне штете у виду угинућа животиња, као и индиректне, које су чак и веће, а настају због губитака у телесном прирасту, производњи млека, количини и квалитету вуне, одбацивању променењих органа, у репродукцији, повећању степена морталитета у коинфекцијама са неким бактеријским и вирусним болестима, као и због трошкова терапије и профилаксе (Вујић и Анић, 1958; Цветковић, 1976; Шибалић и Цветковић, 1996; Taylor и сар, 2007). У нашој земљи су у прошлости паразитске болести проузроковале огромне штете у овчарству са значајним процентом морбидитета и морталитета (Вујић и сар, 1980). Касније, увођењем ефикаснијих и мање токсичних антипаразита, паразитске епизоотије су постале све ређе и попримиле локални карактер (Вујић и сар, 1980). Иако већ више деценија нема већих епизоотија паразитских болести, нити значајнијег процента морталитета, паразитозе које углавном имају хронични ток, ипак наносе велике штете у овчарској производњи.

На пример, Вујић и сарадници (1961) говоре о значају и економским последицама пре свега супклиничке нематодирозе јагњади која се не манифестује проливом већ заостајањем у расту и закржљавањем у виду немогућности остављања јагњади за репродукцију нити могућности клања за добијање меса. Према њима, честа је појава да 40-50% јагњади у запату показују знаке заостајања у расту што доводи до неуједначености у погледу телесне тежине и кондиције на нивоу запата, што је један од главних недостатака у трговини стоком. Зато контрола нематодирозе има велики значај за унапређење овчарства поготово у екстензивним сточарским подручјима где је овчарство најважнији а можда и једини извор прихода (каква је и Сјеничко-Пештерска висораван). Осим тога, ларвице током препатентног периода знатно оштећују слузокожу црева, што између осталог омогућава и врло добре услове за деловање

анаеробних бактерија, где су посебно важне клостридије. Шибалић и сарадници (1961) су установили већи укупан прираст код јагњади мерина, мелеза мерина и Цигаје третираних фенотиозином у односу на нетретирану контролну групу. Како вредност повећаног прираста премашује вредност утрошених антихелминтика, препоручују меру дехелминтизације која се, по њима, економски исплати. Павловић и сарадници (2003) бележе већу производњу млека након дехелминтизације оваца, што је у складу са резултатима из јужне Италије (Cringoli и сар, 2008).

У земљама са развијеним овчарством, желудачно-цревне стронгилиде су такође најважнији узрок економских губитака (McLeod, 1995; West и сар, 2009). Средином деведесетих година (прошлог века), у Аустралији је утврђено да губици услед ПГЕ, који се огледају у смањеној количини меса и вуне и угинућима, износе 141 милион аустралијских долара, док су трошкови профилаксе и терапије 1,7 пута мањи (McLeod, 1995). Други пример је недавна студија губитака услед суплиничке стронгилидозе оваца на Новом Зеланду. Група оваца у супресивном режиму профилаксе/терапије је током трајања студије имале константно статистички значајно већу телесну масу, више концепција и тежу јагњад на залучењу у односу на природно заражене животиње из контролне групе (West и сар, 2009).

Чини се да је, на основу приказаних података, учестала хемопрофилакса (терапија) оправдана, међутим, требало би узети у обзир ризике од неуспеха у контроли ПГЕ које са собом носи раширена појава резистенције на антихелминтике (Jackson и Coop, 2000; Kaplan, 2004; Papadopoulos и сар, 2012; Rose и сар, 2015; Traversa и Samson-Himmelstjerna, 2016). Бројни примери из литературе сведоче неуспешној контроли и појави клиничке болести праћене значајним губицима управо због резистенције на антихелминтике, како код оваца, тако и код других преживара (Yadav и сар, 1993; Jabbar и сар, 2013; Mahieu и сар, 2014).

Резистенција на антихелминтике проузрокује мерљиве губитке у вредностима овчијих производа, који према резултатима пар студија, доводе до смањења вредности јагњећег трупа у нивоу од 10,4% односно 14% (Miller и сар, 2012; Sutherland и сар, 2010). Уз тај налаз се истиче једна веома важна чињеница да су упркос релативно високим FEC вредностима јагњад визуелно показивала добро здравствено стање. Ово је важно јер многи фармери на Новом Зеланду сматрају да ће бити способни да препознају АР на основу производних перформанси њиховог стада. Због тога већина није спремна да уложи у тестирање ефикасности антихелминтика нити да примењује мере које успоравају развој АР (Miller и сар, 2012). У случајевима где је утврђена резистенција неколико врста стронгилида без јасних визуелних знакова паразитизма, економски губици услед резистенције могу знатно премашити трошкове испитивања ефикасности лекова (Miller и сар, 2012). Крајња последица невољности произвођача за контролу антихелминтика и примену мера за успоравање резистенције може да буде развој мултирезистентних изолата који се више не могу контролисати лековима што може да резултира затварањем фарми и прекидом производње, што је и забележено, на пример, у Шкотској (Sargison и сар, 2005).

2.3. Контрола желудачно-цревне стронгилидозе оваца

2.3.1. Употреба антихелминтика

Контрола паразитских болести оваца је заснована на низу мера које укључују контролисано напасање, посебне режиме исхране и узгоја, примену антипаразитета и

биолошке методе. Од побројаних начина, највише се користе антихелминтици чиме се спречава акумулација хелмината у животињама у степену који би штетно деловао на здравствено стање, а поготово на продуктивност животиња, што се може примењивати при различитим условима гајења, на различитим теренима, у свако доба године и на животињама сваке доби. Ова мера је најлакше применљива, најефикаснија и најјефтинија и зато ће се пашне хелминтозе углавном и даље контролисати на овај начин (Цветковић, 1976; Sargison, 2012). За контролу инвазија оваца желудачно-цревним стронгилидама, доступан је читав спектар старих, а од скоро и нових класа антихелминтика који се разликују по хемијском саставу и антипаразитском спектру (бензимидазоли, имидазотиазоли и тетрахиdropиримидини, макроциклични лактони (авермектини и милбемицини), органофосфатна једињења, салициланиди, аминокетонитрилни деривати, циклични октадепептиди, спироиндоли; Sutherland и Scott, 2010; Sargison, 2012).

У хемиопрофилактици разликујемо стратешко и тактичко третирање животиња (Цветковић, 1976). Под првим се подразумева редовно третирање животиња у одређеним периодима године (јесења и пролећна дехелминтизација). Под другим се подразумева третирање животиња и у периодима када на основу епизоотиолошке ситуације и других услова (у годинама са доста падавина, извесно време пред јагњење, при оскудној исхрани и слично) просудимо да је могуће настајање тежих последица па и избијање клиничких хелминтоза. Како је главни циљ стратешког третмана смањити контаминацију пашњака применом дехелминтизације у тачно одређено време што је засновано на познавању епизоотиологије ларвица на локалним пашњацима, широм света су креирани различити програми адаптирани локалним условима (Sutherland и Scott, 2010). У нашим епизоотиолошким условима, после година истраживања, у циљу профилаксе паразитског гастроентеритиса пријемчивих животиња и контаминације пашњака развојним облицима, препоручена су минимално два стратешка третмана одраслих оваца током године (Катић и сар, 1967; Цветковић, 1976; Шибалић и Цветковић, 1996). Први третман се препоручује у пролеће пред изгон на пашу (да би се спречила контаминација паразитима који су се развили током зиме након периода хипобиозе) а други третман после затварања животиња у касну јесен/рану зиму (да би се елиминисала постојећа популација паразита пред период зимске оскудне исхране). Додатни третмани током године се спроводе по потреби у зависности од епизоотиолошке ситуације (нарочито у подручју хемонхозе), првенствено код јагњади, ради лечења клиничког односно супклиничког паразитизма, и може да их буде још најмање 3-4 (Цветковић, 1976).

Међутим, честа и искључива примена антихелминтика у контроли обољења оваца паразитске етиологије има и негативне стране. Тако је доказано да примена макроцикличних лактона (ивермектина) може имати негативне последице по фауну која колонизује измет на пашњаку и учествује у његовој деградацији (Wall и Beynon, 2012; Jacobs и Scholtz, 2015). Осим тога, последњих година расте притисак потрошача који не желе да конзумирају производе од животиња (месо и млеко) у којима има резидуа антихелминтика (Charon, 2004).

Најнеповољнија последица нерационалне употребе антихелминтика је то што терапија и профилакса паразитског гастроентеритиса постаје све мање ефикасна због развоја резистенције желудачно-цревних стронгилида на њихово дејство, и она је веома раширена на глобалном нивоу, и присутна је у свим класама антихелминтика, уз чест налаз мултирезистентних изолата (Kaplan, 2004; Wolstenholme и сар, 2004; Papadopoulos и сар, 2012; Rose и сар, 2015; Traversa и Samson-Himmelstjerna, 2016). Због интензивне употребе, у неким

земљама је ситуација веома озбиљна и достигла је критични ниво (van Wyk и сар, 1999; Cezar и сар, 2010).

То додатно отежава напоре да се применом антихелминтика осигура задовољавајућа продуктивност уз истовремено очување здравља и добробити животиња и намеће императив редовне контроле њихове ефикасности, поготову после много година примене у пракси, како би се одложила појава и успорио развој резистенције.

Вујић и Костовић (1973) први у Србији разматрају могућност појаве резистенције препарата који се користи у борби против паразитоза оваца због перзистенције шуге на неким теренима Војводине, Златибора и Сјеничко-Пештерске висоравни и поред примене високо ефикасног органохлорног препарата НСН (хексахлорциклохексана). Међутим, анализирајући разлоге за могућу појаву резистентних генерација шугараца предност дају нестручној примени препарата у контроли шуге која је последица недовољно систематског рада и непознавања биологије узрочника, јер је не спроводе ветеринари већ сами одгајивачи.

Истраживања која се баве провером ефикасности антихелминтика после дугогодишње употребе против паразита оваца на теренима Србије нема у домаћој литератури. Постоје публикације објављене углавном у домаћим часописима о испитивању ефикасности различитих антихелминтика против желудачно-цревних стронгилида оваца након њиховог увођења у клиничку праксу (на пример Невенић и Младеновић, 1959; Вујић и сар, 1964; Цветковић и сар, 1971; Вујић и сар, 1972; Вујић и сар, 1976; Бошковић и Марковић, 1981; Лалошевић и Симин, 2008).

Многи од ових лекова који су у нашој земљи коришћени у прошлости више нису доступни на домаћем тржишту. Поред тога, број новорегистрованих активних супстанци је веома ограничен, тако да се неки од ефикасних антихелминтика присутних на светском тржишту, попут моксидектина или монепантела на пример, не могу још увек пронаћи код нас. Такође, на нашем тржишту нема течних формулација антихелминтика за пероралну употребу, тзв. „дренч“ препарата који се у свету употребљавају у великим количинама. Потрошачи (ветеринари и одгајивачи животиња) су овде оријентисани на употребу разних прашкастих формулација антихелминтика, таблета, болуса и ињекционих препарата. Према званичним извештајима Агенције за лекове и медицинска средства Србије (АЛИМС) о потрошњи ветеринарских лекова од 2011. до 2013. године (<http://www.alims.gov.rs/latin/veterinarski-lekovi/promet-i-potrosnja-veterinarskih-lekova/>), најпродаванији антихелминтици су ивермектин (преко 10.000 литара ињекционог препарата за три године и преко 10 тона прашка) и левамизол (преко 4.700 литара ињекционог препарата и преко 17,5 тона прашка). Поред тога, продато је преко 2 милиона таблета (болуса) албендазола (различита количина активне супстанце у таблети/болусу). Слично као код нас, и у свету су макроциклични лактони, у које се убраја ивермектин, класа антихелминтика која спада у најпопуларније у последњих 30 година (McKellar и Gokbulut, 2012). Што се тиче доступности овог ендектоида у Србији, лек је на просторима бивше СФРЈ регистрован и уведен у праксу половином 80-их година (Рапић и сар, 1985; Хаџиосмановић, 1986), што значи да је доступан ветеринарима и произвођачима у Србији преко 30 година. Нажалост, званичних података о учесталости његове примене у котроли паразитоза код различитих животињских врста нема, осим студије Симина и сарадника (2013) где је 84% одгајивача користило пасту са ивермектином за дехелминтизацију.

Када се неки антипаразитик налази на располагању произвођачима оваца у Србији, они су склони да га користе по сопственом нахођењу, често без било каквих индикација. Пример за то је дехелминтизација код стајски држаних оваца које или уопште нису изложене

паразитским инвазијама, или је то у малом степену када је лечење непотребно. Давно је постављено питање о неопходности (и фреквенци) третмана антихелминтицима током полуинтензивног това јагњади (напасање + прихрањивање) и донет је закључак да се никако не може дати универзално упутство за дехелмитизацију које би важило у свим случајевима. Заправо, једино меродавно је утврђивање интензитета инфекције и врста паразита да би се адекватно проценило да ли, када и колико пута животиње треба третирати (Шибалић и сар, 1961). Међутим, право је питање у којој мери су препоруке за паразитолошки преглед пре третмана стронгилидозе (и других паразитских болести) оваца заиста заживеле у пракси. У Србији су у периоду након интензивних истраживања паразитофауне оваца и утврђивања њиховог значаја за производњу често рађени копролошки прегледи оваца као део редовне контроле паразитских обољења, а нарочито желудачно-цревне стронгилидозе (Стојадиновић, 1985). Међутим, нема података новијег датума о томе да ли произвођачи, односно ветеринари, раде прегледе пре дехелмитизације. Судећи по резултатима анкетирања одгајивача коња који то најчешће не раде (Симин и сар, 2013), вероватно је да су паразитолошки прегледи који претходе дехелмитизацији веома мало заступљени и у домаћем овчарству, што није изузетак у односу на развијеније земље попут Шпаније, на пример (Pedreira и сар, 2006). Оваква пракса доводи до третирања свих животиња у запату напамет, у складу са старим препорукама, а да при томе нико не узима у обзир чињеницу да се епизоотиологија стронгилидозе променила у складу са климатским променама, што је препознато у свету (Morgan и Van Dijk, 2012). При томе је важно нагласити да се непотребним третманом паразити континуирано излажу активној супстанци чиме се повећава притисак на локалну популацију (ако она уопште постоји!) да развија механизме за преживљавање што води у настанак резистенције.

У неколико наврата су различити аутори током протеклих година указивали на ризике (не)рационалне примене антихелминтика и могућност за појаву резистенције домаћој ветеринарској научној и стручној јавности (Живанов и Илијев, 1989; Димитријевић и Илић, 2004; Ивановић и сар, 2015). Међутим, у нашој земљи се углавном само писало том о проблему. Прве конкретне податке су објавили Симин и сарадници (2014; део налаза докторске дисертације) упозоравајући ветеринаре и одгајиваче да потенцијално проблем са резистенцијом већ постоји на терену. Како су резултати испитивања приказани само за један запат оваца и само за конкретну активну супстанцу, није познато да ли резистенција још негде постоји, колико је раширена и које класе антихелминтика нису довољно ефикасне да успешно контролишу паразитски гастроентеритис у запатима оваца у Србији. Осим овога налаза резистенције паразита у нашој земљи, недавно је забележено и потпуно одсуство ефикасности ектоантипаразита карбарила против ектопаразита живине *Dermanyssus gallinae* (Pavlicevic и сар, 2016).

2.3.2. Примена система напасања

У прошлости је примењивана мера премештања дехелминтисаних животиња на мање контаминиран („чист“) пашњак што је резултирало мањим степеном инвазије и довело је до смањења последица паразитизма. Из искустава у примени овакве праксе је произашло правило да смањивање интензитета контаминације пашњака лежи у основи контроле желудачно-цревних стронгилида (Sutherland и Scott, 2010).

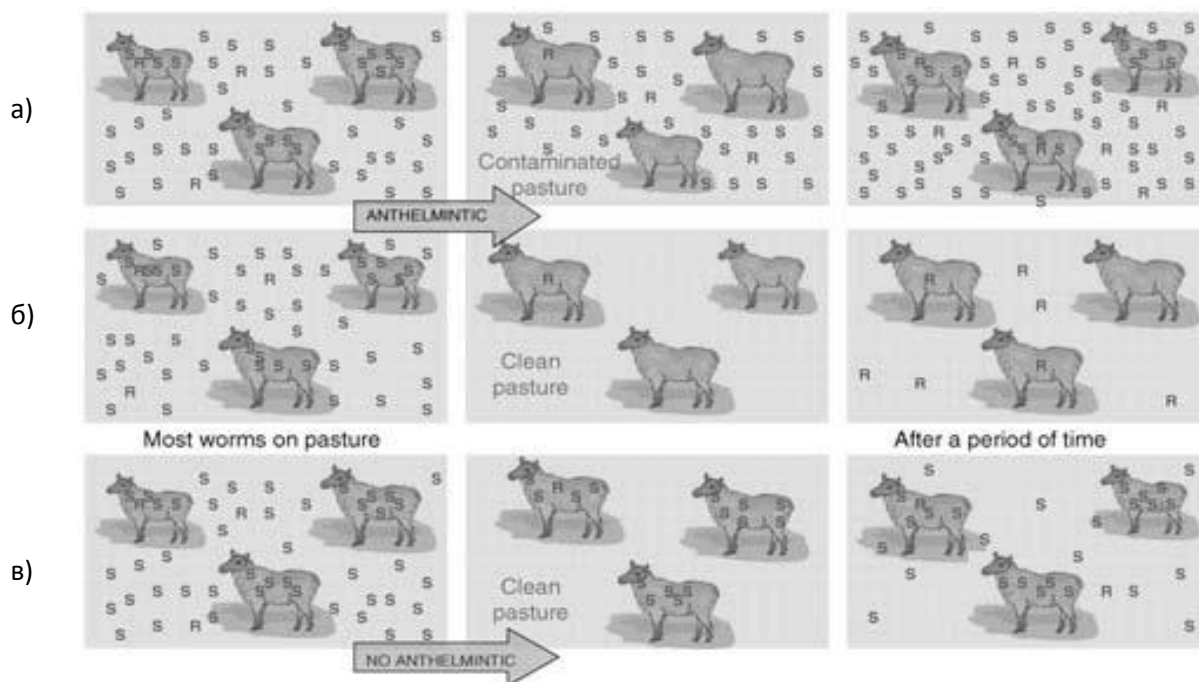
Поред основног програма „третирај и премести“ (drench and shift), постоје бројне практичне модификације манипулације системом напасања које све имају исти циљ, а то је редукција контаминације пашњака (Sutherland и Scott, 2010). Избор система напасања у основи зависи од расположивих површина за напасање, квалитета пашњака и броја оваца (Шибалић и Цветковић, 1996). Ако је број оваца мали, може се практиковати континуирано напасање јер има довољно простора па овце саме бирају боље делове пашњака који су мање контаминисани због мањег коришћења. Међутим ако је број оваца велики, онда би ваљало спроводити прегонско напасање. Системи укључују спорију или бржу ротацију оваца на ограниченим деловима пашњака, уз обавезно напасање млађих категорија пре старијих. Шибалић и Цветковић (1996) дају оријентациони шему прегона за наше епизоотиолочке услове, где је потребно чешће мењати површине у мају и септембру (доста влаге + оптимална температура), ређе у априлу и октобру (нижа температура), а сасвим ретко у току лета (мало влаге + висока температура). При томе не препоручују повратак на исту површину најмање 8-10 недеља, како би дошло до значајног морталитета ларвица.

Научници из Аустралије су искористили утицај врелог, топлог лета као сезонског деконтаминатора за припрему чистих пашњака у регионима са кишним сезонама током зиме, уз интензивну ротацију пашњака која подразумева 3,5 дана напасања и 31,5 дан одмора (O'Connor и сар, 2006). Colvin и сарадници (2008) су постигли најбољи ефекат применом интензивне ротације прегона у пределима Аустралије са доминантно летњим падавинама. Посебан систем напасања који у основи има ротацију, назван „smart graze summer rainfall“, су усавршили Bailey и сарадници (2009). Суштина овога система је да се у касно пролеће, односно рано лето, после употребе ефикасног антихелминтика овце у 2 наврата интензивно напасају на ограниченој површини пашњака највише 21 дан (то је дужина препатентног периода већине врста желудачно-цревних стронгилида) да би смањењем биљне масе поспешиле смртност л3 ларви, које су изложене сунцу и УВ зрачењу и унеле што већи број ларви остављајући пашњаке ниско контаминираним за пролећно јагњење следеће сезоне.

На слици 7 је илустровано шта се догађа са контролом паразитског гастроентеритиса (ПГЕ) у случајевима претходно описаних мера контроле стронгилида оваца које укључују програме „третирај и премести“ или се заснивају на ротацији прегона, уз услов да се код дела локалне популације развила резистенција као последица примене антихелминтика.

Једна од алтернативних мера система напасања је употреба говеда у смањењу инфективности пашњака која се темељи на специфичности већине врста желудачно-цревних стронгилида за домаћина које су или слабо или потпуно неадаптиране за супротну врсту (Sutherland и Scott, 2010). Поред доброг успеха ове мере у другим студијама у свету (нпр. Mahieu и Aumont, 2009), хипотезу да би се контрола стронгилдозе оваца и говеда могла допунски контролисати истовременим, односно ротацијским, напасањем у епизоотиолошким условима појединих крајева наше земље је потврдио Крџалић (1966) у ранијим истраживањима. Међутим, велики недостатак ова метода може имати у крајевима где нема уопште или нема довољно говеда да се реализује (Симин, 2009).

Слика 7. Промена статуса резистенције код комбинације третмана и прегона на пашњаке различитог степена контаминације (Sargison, 2009).



а) дехелминтизација + прегон на контаминиран пашњак - доводи до благог повећања резистентних генотипова стронгилида, али резултира у паду продуктивности услед лоше контроле ПГЕ;

б) дехелминтизација + прегон на чист пашњак - пружа одличну контролу ПГЕ, али доводи до настанка резистенције после неког времена;

в) не третирани овце + прегон на чист пашњак – не доводи до резистенције, али се контрола ПГЕ одржава кратко због брзе контаминације претходно чистог пашњака.

2.3.3. Остале методе контроле

Једна од мера контроле желудачно-цревне стронгилидозе оваца која је део интегрисаног приступа у борби против паразитоза је појачана исхрана која доводи до јачања одбрамбене способности организма који се лакше избори са инвазијом (Coop и Kyriazakis, 1999), и заузима важно место у пракси као допунска метода (Sutherland и Scott, 2010). Узгој раса које су се показале као природно отпорније према инвазији стронгилидама (цигаја наспрам мерина; Цветковић и сар, 1970; Цветковић и сар, 1973) представља ефикасну алтернативу употреби лекова (Diez-Tascón и сар, 2005) и релативно је једноставна и јефтина у смањењу утицаја које има инфестација нематодама (Charon, 2004). Природна отпорност према желудачно-цревним стронгилидама је умерено наследна, па су створене линије са значајном разликом у нивоу FEC између отпорних и пријемчивих животиња (Diez-Tascón и сар, 2005). Постоје и комерцијалне фарме на Новом Зеланду које продају приплодна грла линија оваца селекционисаних на резистенцију на стронгиледе (<http://www.sil.co.nz/About-SIL.aspx>). Напасање на површинама засејаним биљкама које имају секундарне метаболите који делују против паразита, примена нематофагних гљива, примена различитих биљних екстраката, хомеопатија и друго, су још неке од метода које се користе са мање или више успеха у борби против желудачно-цревне стронгилидозе оваца (Sutherland и Scott, 2010).

2.3.3.1. Примена нематофагних гљива

Нематофагне гљиве су разнолика и убиквитарна група микрогљива које користе нематодe као примарни извор хране или опортунистички да би допунили свој природни сапрофитски начин живота (Larsen и сар, 1991). Припадају класи *Deuteromycetes* или *Fungi Imperfecti*, и укључују оне које су предатори, ендозоиични паразити или паразити јаја нематода (Waller и Faedo, 1993). Њихов потенцијал за биолошку контролу је значајну пажњу добио 80-их година прошлог века у борби против патогених нематода цвећа. Примена у контроли паразитских нематода животиња је била мање у фокусу, а огледи су рађени углавном са родом *Arthrobotrys*, нарочито врстом *A. oligospora* (Waller и Faedo, 1993).

2.3.3.1.1. *Duddingtonia flagrans*

После искустава са *A. oligospora*, вршена су интензивна испитивања да се пронађу изолати гљива чије хламидоспоре имају дебелу опну, попут врсте *Duddingtonia flagrans*, што би им омогућило да прођу кроз ГИТ животиња и формирају мицелијум у измету хватајући ларвице трихостронгилида у развоју (Larsen и сар, 1991; Larsen и сар 1992). Циљ примене ове гљиве је да се контаминација пашњака сведе на минимум (Gómez-Rincón и сар, 2006) и смањи зависност, односно учесталост, примене антипаразитета и тиме притисак на развој резистенције. Нематофагна гљива *D. flagrans* насељава различите нише у земљишту и ризосфери где се храни низом слободноживећих нематода земљишта као главним (облигатне паразитске гљиве) или додатним извором хране, живећи углавном као сапрофит на мртвој органској материји (Larsen и сар, 1997). Савремена истраживања показују да су хламидоспоре појединих изолата *D. flagrans* способне да преживе пасажу кроз желудачно-цревни тракт животиња (Larsen и сар 1992) и смање број инфективних ларви (Л₃) које се налазе у измету (Gómez-Rincón и сар, 2006). Смањена популација ларви на биљкама резултира мањим укупним бројем паразита у животињама, до тог нивоа да ће не само клиничка болест него и субклинички ефекти изазвани паразитима бити спречени. У исто време смањење броја Л₃ на пашњаку би требало да стимулише развој природно стеченог имунитета у младих јединки (Larsen и сар, 1997).

2.3.3.1.2. Историјат, порекло и распрострањеност

Duddingtonia flagrans је нематофагна гљива коју је 1947 године изоловао С. L. Duddington из компостираног поврћа на Бедфорд колеџу у Лондону (Велика Британија) и описао као *Trichothecium flagrans* (Duddington, 1949). Током времена мењала је свој назив, па постоји неколико синонима које се односе на ову врсту:

- *Trichothecium flagrans* Dudd., 1949
- *Arthrobotrys flagrans* (Dudd.) Sidorova, Gorlenko & Nalepina, 1964
- *Arthrobotrys flagrans* (Dudd.) Mekht., 1964
- *Duddingtonia flagrans* (Dudd.) R.C. Cooke, 1969

Scholler и сарадници (1999) вратили гљиву на стару класификацију (***Arthrobotrys flagrans***), како и званично гласи име врсте (Zhang и Hyde, 2014), а неки аутори су нагласили да још увек користе име *Duddingtonia flagrans* да би остали доследни публикацијама које се односе на биолошку контролу нематода (нпр. Skipp и сар, 2002, Wang и сар, 2015). Осим тога,

на веб презентацијама релевантних миколошких кућа старо име врсте које је предложио Cooke (1969), је још увек актуелно и гласи:

***Duddingtonia flagrans* (Dudd.) R.C. Cooke, 1969**

(GBIF Secretariat, 2016,

<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000067&Rec=9219&Fields=All>).

Према важећој таксономској класификацији, *Duddingtonia flagrans* припада фамилији *Orbiliaceae* (GBIF Secretariat, 2016). Таксономска класификација је приказана у Табели 2.

Табела 2. Таксономска класификација *Duddingtonia flagrans*

Таксономска категорија - латински	Таксономска категорија - српски	Назив таксона
<i>Regnum</i>	Царство	<i>Fungi</i>
<i>Phylum</i>	Коло	<i>Ascomycota</i>
<i>Classis</i>	Класа	<i>Orbiliomycetes</i>
<i>Ordo</i>	Ред	<i>Orbiliales</i>
<i>Familia</i>	Породица	<i>Orbiliaceae</i>
<i>Genus</i>	Род	<i>Duddingtonia</i>
<i>Species</i>	Врста	<i>Duddingtonia flagrans</i>

Оригинални изолат је депонован 1950 године у холандску колекцију гљива у Утрехту (Centraalbureau voor Schimmelcultures, CBS) где је добио идентификациони број CBS 565.50 (<http://bccm.belspo.be/catalogues/mucl-strain-details?NUM=9827>). Према подацима доступним на веб страници о сојевима различитих микроорганизама (<http://www.straininfo.net/strainPassport.action?sort=sequenceLength&dir=asc&cultureId=189243>)

постоји неколико синонима који се односе на исти оригинални изолат *Duddingtonia flagrans* који су у светским миколошким колекцијама заведени под различитим шифрама (табела 3). Исти изолат је из Холандије депонован у неколико светских колекција гљива где је заведен под различитим бројевима (у Белгији као изолат MUCL 9827) (табела 3).

Табела 3. Синоними који се односе на називе изолата *Duddingtonia flagrans* MUCL 9827 у различитим миколошким колекцијама

Идентификациони број изолата	Место депоновања	Време депоновања
CBS 565.50	Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Утрехт, Холандија	1950. година
MUCL 9827	Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, Левен, Белгија	1968. година
ATCC 13423	American Type Culture Collection, Манасас, Вирџинија, САД	Није наведено
IMI 101314	CABI Bioscience Genetic Resource Collection, Велика Британија	Није наведено
BCRC 32917	Bioresource Collection and Research Center, Food Industry Research and Development Institute, Хсинчу, Тајван	Није наведено

Извори: <http://www.straininfo.net/strainPassport.action?sort=sequenceLength&dir=asc&cultureId=189243>;
<http://bccm.belspo.be/catalogues/mucl-strain-details?NUM=9827>;
<http://www.vkm.ru/tbl2.php?vkm=Duddingtonia%20flagrans>.

Zhang и Hyde (2014) наводе да је *Duddingtonia flagrans* присутна у Уједињеном Краљевству, Немачкој и Русији. Међутим, судећи по бројним референцама, може се рећи да је *D. flagrans* космополитска врста која се налази скоро на свим континентима и може се изоловати из различитих супстрата (Табела 4).

Табела 4. Распрострањеност различитих изолата *Duddingtonia flagrans* у свету и врста супстрата из којих су изоловани

Идентифика- циони број изолата	Земља пореkla	Година	Супстрат	Референца/линк
CBS 565.50 (MUCL 9827) (ATCC 13423) (IMI 101314)	Енглеска	1947	Компост	Duddington, 1949; http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS%20strain%20database&Rec=13694&Fields=All
F-2574	Русија	Није наведено (вероватно крајем 50-их година XX века)	Земљиште	http://www.vkm.ru/Catalogue.htm
CBS 143.83 (IMI 138220)	Велика Британија	1969	Земљиште	Cooke, 1969; http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS%20strain%20database&Rec=29404&Fields=All
/	Француска	/	Земљиште	Virat, 1977 http://bccm.belspo.be/catalogues/muc-l-strain-details?NUM=MUCL%2028429&LIST1=STRAIN_NUMBER&TEXT1=&LIST2=NAME&TEXT2=duddingtonia%20flagrans&LIST3=ORGANISM_TYPE&TEXT3=&LIST4=ORIGINAL_SSTR&TEXT4=&LIST5=ALL%20FIELDS&TEXT5=&CONJ=OR&RANGE=20
MUCL 28429 (ATCC 38101) (CRT 76054)	Француска	1984	Земљиште	Rosenzweig, 1984; http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS%20strain%20database&Rec=35649&Fields=All
CBS 561.92 (ATCC 56923)	САД?	Није наведено	Није наведено	
Troll A 8 изолата: C13 (DSM 6703) C14 C15 CIII1b CIII2b CIII3 CIII4 CIII5	Данска	1986	Измет говеда	Grønvold и сар, 1996
	Данска	1989	Земљиште и компост	Larsen и сар, 1991; Wolstrup и сар, 1994; Grønvold и сар, 1996
F-882	Русија	1989	Земљиште	http://bankpatentov.ru/node/7

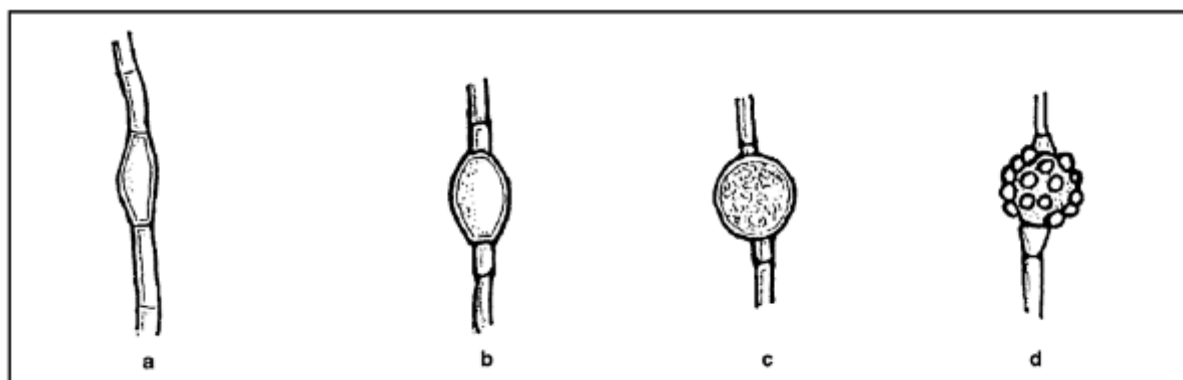
Идентифика- циони број изолата	Земља порекла	Година	Супстрат	Референца/линк
(Т-89)				4815
CBS 342.94	Немачка	1991	Осушени биљни материјал	http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS%20strain%20database&Rec=36586&Fields=All
CBS 583.91 (INEM 17770)	Немачка	1991	Земљиште	http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS%20strain%20database&Rec=34975&Fields=All
CBS 343.94	Калифорнија, САД	1992	Осушени биљни материјал	http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=CBS%20strain%20database&Rec=36587&Fields=All
Није наведено	Канада	1992	Измет говеда	Mahoney и Strongman, 1994
16 изолата; идентиф. бројеви нису наведени	Аустралија	1992-1993	Измет животиња	Larsen и cap, 1994
CG722	Бразил	1997	Измет	Luz и cap, 2007
CG768	Бразил	Није наведено	Измет козе	Santos и cap, 1998; Cruz и cap, 2009
FTHO-8	Мексико	Није наведено	Измет оваца	Llerandi-Juárez и Mendoza-de Gives, 1998
2 изолата; идентиф. бројеви нису наведени („Gujarat“ изолат?)	Индија	Није наведено	Измет оваца и буфала	Sanyal, 2000
1 изолат; идентиф. број није наведен	Малезија	1997-2000	Измет оваца	Chandrawathani и cap, 2002
8 изолата (13 укупно изоловано): 48hC 48iC 93eC 126hR 144fR 144jR 145dR 185fR	Нови Зеланд	1997-1998	Измет животиња (говеда и коња, свеж и сув); органски материјал из сило-јаме; отпад са травњака	Skipp и cap, 2002
5 изолата; идентиф. бројеви нису наведени	Јужна Африка	Није наведено	Компост и труло лишће	Durand и cap, 2005
AC001	Бразил	Није наведено	Земљиште	Dias и cap, 2007

Идентификациони број изолата	Земља порекла	Година	Супстрат	Референца/линк
ARSEF 5701	Бразил	Није наведено	Није наведено	Jobim и сар, 2008
„Chhattisgarh“ изолат	Индија	Није наведено	Није наведено	Sanyal и сар, 2008
Није наведено	Ирска	Није наведено	Измет оваца	Kelly и сар, 2009
RPAN10 (JX979094) (NTF1)	Индија	2011-2015	Земљиште	Pandit, 2014 Patel и сар, 2015
1 изолат; идентиф. број није наведен	Бразил	Није наведено	Земљиште	de Araújo, 2014
Није наведено	Аргентина	Није наведено	Измет говеда	Saumell и сар, 2015
4 изолата*: SDH 035 SDH 091 SFH 089 SFG 170	Кина	2012-2014	Свежи и компостиран измет оваца	Wang и сар, 2015 *ово истраживање је део обимнијег спроведеног у Кини (референца испод)
24 изолата; идентиф. бројеви нису наведени	Кина	2012-2014	Свежи и компостиран измет, и земљиште са пашњака	Cai и сар, 2016

2.3.3.1.3. Морфологија и особине

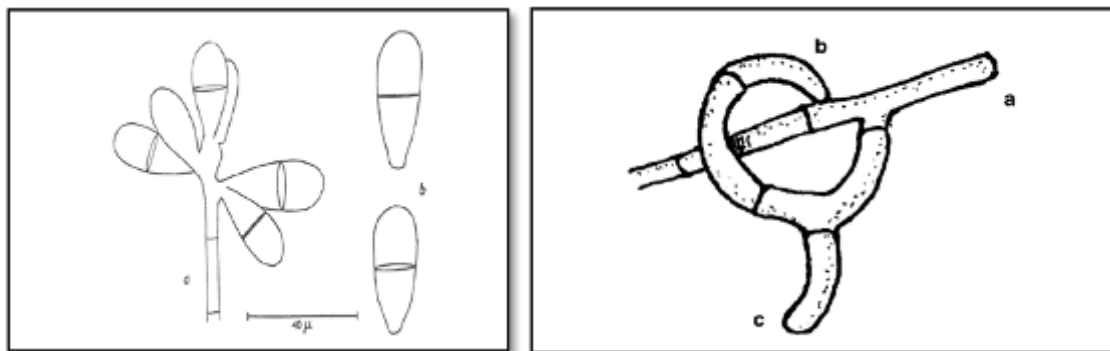
Разликује се неколико морфолошких структура *D. flagrans*. Мицелијум је изграђен од правих, септираних, хијалиних хифа различите дебљине (Duddington, 1949; Cooke, 1969). На њему се развијају хламидоспоре које могу имати различит облик у зависности од зрелости (слика 8; Grønvold и сар, 1996).

Слика 8. Хламидоспоре различите зрелости (a-најмања и d-највећа зрелост; Grønvold и сар, 1996)



Конидиофоре се издижу из мицелијума појединачно, праве су, могу и не морају да се гранају, дужине од 50-200 μm . Конидије (слика 9) су обовоидног облика, имају једну септу која их дели на два подједнака дела и лако клијају (Duddington, 1949; Cooke, 1969).

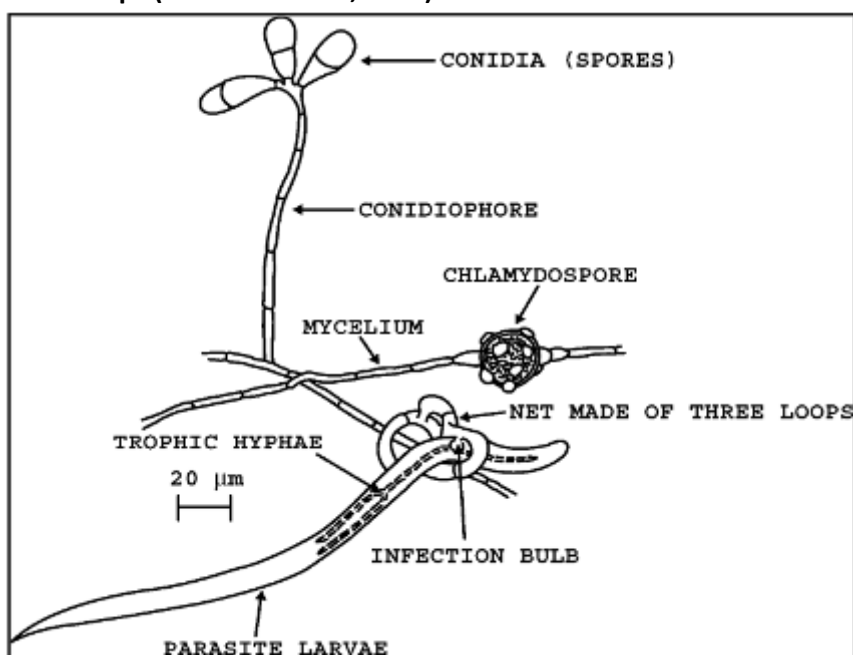
Слика 9. Изглед врха конидиофоре са 6 конидија (лево; Duddington, 1949) и тродимензионалне замке (десно; Grønvald и сар, 1996).



У контакту са нематодама *D. flagrans* развија тродимензионалне адхезивне мреже – **замке** (слика 9), које настају гранањем и увртањем хифа и прављењем анастомоза. Хифе које су формирају замке су обично садржале густу цитоплазму са бројним великим вакуолама. Екстерни дијаметар замки је обично био у распону од 35-65 а интерни 25-40 μm (Duddington, 1949).

Укратко после хватања у замку, док је нематода још жива, кутикула ларвице бива пробијена кратком израслином која потиче са места контакта из замке за коју је ларва залепљена. Израслина се шири у телу нематодe и формира булбус из којег расту трофичне хифе које ће апсорбовати њен садржај (Duddington, 1949). Све структуре *D. flagrans*, укључујући и механизам пенетрације и раст трофичних хифа, су илустроване на слици 10 (Soder и Holden, 2005).

Слика 10. Морфолошке структуре *D. flagrans* са илустрацијом хватања ларвице нематодe и развоја трофичних хифа (Soder и Holden, 2005).



D. flagrans расте добро на чврстим и течним подлогама уз променљиве осцилације у брзини раста на различитим температурама и вредностима рН (Gardner и сар, 2000; Boguš и сар, 2005). Уз то, веома успешно се може култивисати на зрневљу разних житарица, што у мноме појефтиније масовну производњу хламидоспора (Sanyal, 2000; Chandrawathani и сар, 2002). Може да продукује различите супстанце попут антибиотика флагранона А, Б и Ц (Anderson и сар, 1999) и мноштва ензима укључујући серин протеазу, фосфолипазу Ц, липазе и пектин-разграђујуће ензиме (Meyer и Wiebe, 2003; Braga и сар, 2012).

2.3.3.1.4. Утицај на околину

Код *in vivo* примене ове нематофагне гљиве, хламидоспоре које животиње избаце заједно са изметом у спољашњу средину контаминирају пашњак и околину. Постојала је забринутост како ће се концентрисање велике количине хламидоспора (поготово се то односи на изолате који нису локални него су унети вештачки) одразити на фауну земљишта. Истраживања која се односе на утицај *D. flagrans* на локалну микрофауну која колонизује измет, су показала да ова врста нематофагних гљива нема никакав штетан утицај (Yeates и сар, 2002; 2003; Paraud и сар, 2007а). *D. flagrans* има веома ограничен раст изван фекалне масе у околно земљиште после храњења оваца или говеда хламидоспорама (Faedo и сар, 2002).

2.3.3.1.5. Примена *D. flagrans*

Према малобројним подацима из литературе, *D. flagrans* се може користити за сузбијање патогених нематода у биљној производњи. На пример, у Русији се *D. flagrans* (изолат F-882) успешно користи у сузбијању нематода у производњи повртарских култура, где је примена биопрепарата на бази ове гљиве показала резидуално дејство и стимулативни раст током три производна циклуса код краставца (Теплякова и Ананько, 2009). С друге стране, у истраживању Den Belder-а и Jansen-а (1994), гљива није била успешна против нематода корена из рода *Meloidogyne*.

Много распрострањенија је примена *D. flagrans* у контроли нематода животиња, где се примењују хламидоспоре (Sanyal и Mukhopadhyaya, 2003; Campos и сар, 2009), конидије (Campos и сар, 2009; Braga и сар, 2013а), мицелијум (специјална формулација пелета са натријум алгинатом за коње, овце и говеда (Braga и сар, 2009; Silva и сар, 2009; Silva и сар, 2013)), лиофилозоване хламидоспоре (Santurio и сар, 2009), а међу последњима су развијени протеински филмови соје са импрегнираним хламидоспорама гљиве (Ciannopaea и сар, 2013).

Примењена у разним дозама и формулацијама, *D. flagrans* се користила у бројним огледима који су укључивали интеракцију са ларвицама различитих врста желудачно-цревних и плућних нематода оваца (Larsen и сар, 1998; Fontenot и сар, 1999; Gómez-Rincón и сар, 2006), коза (Paraud и сар, 2005; 2006; 2007; Vilela и сар, 2012), говеда (Wolstrup и сар, 1994; Larsen и сар, 1995; Dias и сар, 2007), свиња (Nansen и сар, 1996), коња (Larsen и сар, 1996; Лукьянченко, 2000; Baudena и сар, 2000), паса (Maciel и сар, 2009; Braga и сар, 2013а), нојева (Braga и сар, 2013б), мишева (Morgan и сар, 1997) и слободноживећих нематода (Mendoza-De Gives и сар, 1999).

Скорашња истраживања руских научника су показала да водени и етанолни екстракти *D. flagrans* имају ниску токсичност на културу *Vero* ћелија и да инхибирају умножавање *Herpes*

simplex вируса типа 2, ектромелија и вакцинија вируса у овој цитолошкој линији (Ibragimova и сар, 2015). Закључили су да екстракти гљиве могу учествовати у креирању антивирусних лекова широког спектра против ДНК вируса.

2.3.3.1.6. Дозно-зависни ефекат *D. flagrans* приликом примене код оваца

Након пероралне (р/о) апликације, хламидоспоре дате овцама треба да преживе пасажу кроз ГИТ и да у измету развију структуре за хватање ларви (L_3) и ухвате их пре него што напусте измет и стигну на околну вегетацију. Да би се то постигло, аутори саветују употребу протокола који подразумевају дозирање веома високом концентracијом хламидоспора. Према том приступу, повећањем концентрације спора повећава се вероватноћа да се ухвати већи број L_3 . Зато је уложен велики напор да се одреди оптималан број спора датих р/о како би се постигла максимална редукција L_3 код оваца и коза али није потврђен јасан и константан дозно зависни ефекат (Ojeda-Robertos et al, 2008a). Углавном је дозирање оваца (коза) било по кг ТМ, а најчешћа доза је била 5×10^5 (Chandrawathani и сар, 2004; Ере и сар, 2009; Fontenot и сар, 2003; Larsen и сар, 1998; Paraud и Chartier, 2003; Paraud и сар, 2005a; Рећа и сар, 2002). Santurio и сарадници (2011) су, међутим, свакодневно хранили овце гљивом током годину дана 50х мањом дозом, која је укупно износила 10^6 спора по грлу, и постигли редукцију ларви на пашњаку експерименталне групе за око 37%, и нису морали дехелминтисати експерименталну групу за разлику од контролне (интервенисали су 3 пута, при чему је као критеријум за лечење посматрана медијана у броју јаја по граму измета у групи, а интервенисано је када је ова вредност била изнад 500 јпг).

Како различити аутори у претходним истраживањима о оптималној дози нису успели да утврде крајњи број спора у измету, Ojeda-Robertos (2008), је са сарадницима развила технику бројања што је омогућило истраживање утицаја различитих доза р/о апликованих спора на коначни број спора у измету и њихову ефикасност у смањењу броја L_3 , као и на то како однос између коначног броја спора и броја јаја у измету (ХПГ:ЈПГ) утиче на ефикасност редукције L_3 . Према њиховим резултатима (Ojeda-Robertos et al, 2008a), најбоља редукција L_3 је била у средњем односу ХПГ:ЈПГ (између 5 и 10:1), а опала је кад је број спора на једно јаје био > 10. То значи да је установљено да се редукција повећава док не дође до појаве засићења ХПГ, тако да и када се повећава р/о доза гљиве то не мора нужно да значи и бољи ефекат односно бољу редукцију L_3 .

Природно заражене овце имају различит ниво инфекције који се мери бројем јаја паразита по граму измета. Ако дозирамо овце гљивом по кг телесне масе, без познавања нивоа инфекције, однос ХПГ:ЈПГ често неће бити оптималан па ће максимална редукција L_3 изостати. Ojeda-Robertos и сарадници (2008) су прво давали гљиву, а после посматрали однос ХПГ:ЈПГ и донели закључке о оптималном односу. Потребно је поставити контролисану *in vitro* студију где се доза гљиве у тесту копрокултуре формира у односу на ниво инфекције, односно ЈПГ вредност, да би се пронашао најбољи, односно оптимални учинак на редукцију L_3 без непотребног расипања ресурса. Подаци добијени из ове студије чиниће добру полазну тачку за примену на терену, као и за преиспитивање протокола и дизајна експеримента уколико дође до неуспеха. Стечена знања могу допринети бољем разумевању потребе за оптималним дозирањем гљиве и да ли таква употреба *D. flagrans* на фармама може смањити контаминацију пашњака а тиме и умањити или спречити поновно заражавање оваца што ће

смањити економске губитке, омогућити рационалнију употребу лекова и тако допринети производњи у овчарству смањењем резидуа лекова у месу, што је у складу са захтевима потрошача и посебно значајно са аспекта здравствене безбедности хране за људе.

2.3.3.2. Примена вакцина

Због проблема резистенције на антихеминтике који не спречава губитке које изазивају желудачно-цревне стронгилиде оваца, што је најважнији проблем на глобалном нивоу, истраживачи су годинама тражили алтернативна решења за њихову контролу. Једна од мера је и примена вакцине против хелмината. У протеклим деценијама су се изводили успешни експерименти вештачког имунизовања оваца против извесних врста желудачно-цревних (и плућних) нематода, помоћу ларвица инактивисаних радијацијом, екстракта ларвица, екскреторно/секреторних (Е/С) продуката и, коначно, циљаних антигена (Шибалић и Цветковић, 1996; Newton и Munn, 1999; Симин, 2009). Доказано је да је вакцинација пречишћеним Hcsl3 антигеном допринела значајном смањењу броја јаја у измету и укупног броја одраслих стронгилида ако је дата уз одговарајући носач (Симин, 2009), а било је успеха применом вакцина које су заснованих на другим антигенима за најважније врсте стронгилида оваца (Newton и Munn, 1999). Дуго ниједан производ није регистрован за комерцијалну употребу, углавном из комерцијалних, некада и економских и политичких разлога (Newton и Munn, 1999), све до 2014. године када је у Аустралији први пут у свету регистрована комерцијална вакцина против хемонхозе (Barbervax) која се базира на екстрактима дигестивног тракта нематод, развијена од стране шкотских паразитолога и успешна у пракси (Smith, 2014). Поред ове врсте, постигнут је успех и у развоју вакцине против *Teladorsagia circumcincta* (Nisbet и сар, 2013), која се успешно примењује, за сада, само у истраживачке сврхе. Вакцинација оваца против желудачно-цревних стронгилида представља једну од мера која може највише допринети у контроли паразитоза, имајући у виду немогућност развоја резистенције на вакцину (Smith, 2014), али је за сада доступна само за поједина тржишта.

3. НАУЧНА ХИПОТЕЗА И ЦИЉ РАДА

На основу чињеница разматраних у поглављу ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ, дефинисано је неколико научних хипотеза. Последња хипотеза представља **главну научну хипотезу**. Имајући у виду сложеност постављеног задатка, изнето је неколико **помоћних научних хипотеза** чије доказивање логично претходи главној хипотези:

1. Желудачно цревне стронгилиде оваца на посматраном имању изазивају паразитски гастроентеритис (ПГЕ) који може имати значајан утицај на здравље, добробит и производне параметре оваца;
2. Терапија и профилакса ПГЕ заснована на употреби ивермектина, најчешће коришћеног антихелминтика на имању, није довољно ефикасна због резистенције желудачно-цревних стронгилида оваца на овај антихелминтик;
3. Испитивани изолат нематофагне гљиве *Duddingtonia flagrans* MUCL 9827 испољава биолошки ефекат (способност хватања инфективних ларвица стронгилида оваца) у *in vitro* условима;
4. Најбољи ефекат изолата гљиве *Duddingtonia flagrans* MUCL 9827 *in vitro* постиже се формирањем доза заснованим на оптималном односу ХПГ:ЈПГ.

Ради потврђивања или одбацивања постављених хипотеза, обављена су истраживања по јасно формулисаним **циљевима (задацима)**:

1. Испитивање желудачно-цревне стронгилидозе оваца на посматраном имању:
 - а) Клиничким методама,
 - б) Лабораторијским методама;
2. Конструисање ама за скупљање измета оваца за потребе истраживања;
3. Испитивање ефикасности ивермектина против желудачно-цревних стронгилида оваца;
4. Испитивање особина и нематофагне активности изолата гљиве *Duddingtonia flagrans* MUCL 9827 у *in vitro* условима;
5. Испитивање *in vitro* ефекта изолата нематофагне гљиве *Duddingtonia flagrans* MUCL 9827 на желудачно-цревне стронгилиде оваца.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Паразитолошка испитивања оваца

4.1.1. Место експерименталног истраживања и подаци о животињама

За потребе израде докторске дисертације, изабран је запат оваца расе Виртемберг (или Merinolandschaf, немачки) надомак Србобрана (45.34° N; 19.48°E; 80 м надморске висине), места у истоименој општини смешеној у Јужнобачком округу у централном делу АП Војводине. Према Попису пољопривреде 2012. године, у општини Србобран се напаса 37,13 % од 3218 оваца (РЗС, 2013).

4.1.1.1. Подаци о климатским параметрима

Тачан приказ климатских параметара у Србобрану је отежан јер нема метеоролошке станице која мери климатске податке за ову локацију. Уместо тога, приказани су подаци из метеоролошког годишњака Републичког хидрометеоролошког завода (http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/klimatologija_godisnjaci.php) за метеоролошку станицу Римски Шанчеви око 35 км удаљену од Србобрана. Изабран је десетогодишњи период у распону од 2005.-2014. године зато што за испитивани запат оваца постоји детаљна историја дехелминтизације доступна од 2005. године, а климатски подаци могу помоћи у разумевању епизоотиологије желудачно-цревних стронгилида оваца.

4.1.1.2. Подаци о фарми и животињама

Овце су у приватном власништву породичног пољопривредног газдинства, и узгајају се полуинтензивно са циљем производње товне јагњади. Узгој оваца датира од 1992/1993. године и број животиња се годинама прогресивно увећавао до 100 јединки (углавном сопствени приплодни материјал и део купљених оваца у почетку). Стадо сада броји 150 јединки (укључујући и приплодну шиљежад и јагњад). Пре оваца су на имању узгајане козе и то од средине 80-тих (прва коза купљена 1982/1983), када је држано 20-30 коза на фарми, до 1992/1993. Козе су све време напасане током пашне сезоне. Има података да је на имању у три наврата било оваца других власника: 1) 40-50 комада које су пасле са козама две године (почетак 90-их, непосредно пре набавке сопствених оваца); 2) 70-80 оваца са другог приватног поседа у Србобрану (1995-1997); 3) 30-ак оваца пореклом са фарме у Ловћенцу (2008-2010). Овце других власника у наведеним периодима су делиле пашњак са сопственим. Нема података о паразитској инвазији и историји дехелминтизације тих оваца. На газдинству уз овце увек има и једна или више крава, има свиња, до 2014. године је било и коња, али се ове врсте не напасају заједно са њима.

Одрасле овце пасу током целе године на природном пашњаку који се налази уз реку Кривају. Како је са једне стране речно корито, а са друге оранице, пашњак је прилично дугачак (овце прелазе по неколико километара дневно уз реку). Ширина пашњака варира у зависности од нагиба терена и удаљености ораница и не прелази 50 метара. Због близине ораница, на појединим местима веома је узан (отприлике и до 10-ак метара, а постоје и „уска грла“ ширине свега неколико метара) што доводи до концентрисања животиња током паше. Овце су на паши од раног пролећа (крај марта, почетак априла) до касне јесени (крај новембра, почетак

децембра) у зависности од временских услова. Јагњад се не напасају. Пашњак је углавном слабијег квалитета што зависи од ботаничког састава делова пашњака. Тако количина доступне хране током пашне сезоне зависи од температуре и количине и расподеле падавина током године. Поред пашњака, овце се изгоне и на стрништа након жетве пшенице, соје и бербе кукуруза у одговарајућем периоду године. Јагњење није сезонски условљено јер су овнови стално међу овцама. Најчешће се већина оваца ојагњи између октобра и децембра месеца. Постоји мањи број оваца који се јагњи у току пашне сезоне у периоду од априла до јула, али број летњих јагњади је ретко већи од 10-15. Вакцинација оваца и јагњади против клостридијалних инфекција се спроводи два пута годишње. Захваљујући детаљно вођеној евиденцији о дехелминтизацији (од 2005. године до данас), анализирана је доступна документација и направљена табела о врсти коришћених препарата, фреквенци третмана, броју и старости третираних животиња и др.

4.1.2. Клинички преглед оваца

Клинички преглед није вршен у редовним временским интервалима нити је прегледан одређен број животиња током изласка на терен. Циљ клиничког прегледа је, пре свега, било препознавање симптома на основу којих се може поставити сумња на паразитски гастроентеритис. На посматраном газдинству, клиничка опсервација и преглед оваца је вршена стандардним методама (адспекција, палпација, аускултација) у периоду од 2011. до 2015. године. То је спровођено периодично током сваке пашне сезоне, на нивоу целог запата а, по потреби, спроведен је и преглед појединачних оваца. Праћена је појава симптома који би указали на паразитизам као што су слабија кондиција, подвлични едем, асцитес, или дијареја. Посебно су прегледане коњуктиве ока и усна слузокожа како би се проценило да ли животиње имају анемију која може да буде изазвана хемонхозом. У почетку је само регистровано бледило слузокоже, а касније је спровођена прецизнија процена клиничке анемије применом FAMACHA® дијаграма, који су набављени 2013. године. Нарочито пажљиво су прегледане јединке које су заостајале за стадом. Такве животиње су индивидуално клинички прегледане.

Од појединачно прегледаних оваца, без обзира на присуство симптома, су узимани узорци измета директно из ректума ради потврде клиничког/супклиничког паразитизма помоћу лабораторијских копролошких претрага. Конзистенција измета узетог из ректума оваца код којих је посумњано на клинички паразитски гастроентеритис је такође евидентирана.

4.1.2.1. Примена FAMACHA® дијаграма у процени анемије

Животиње су прегледане помоћу FAMACHA® дијаграма током 2013. и 2014. године. Током 2013. су прегледане све овце прво у јулу када су и третиране антипаразитицима, а затим у августу 23 дана након дехелминтизације како би се проверио утицај третмана на промену FAMACHA® оцена. У новембру 2013. је прегледано само 10 шиљежица. Током 2014. године је такође урађен преглед у два наврата, где је у септембру прегледано 50, а у новембру 20 оваца, али је преглед допуњен узимањем узорака измета за копролошку претрагу (модификована метода по McMaster-у аналитичке осетљивости 25 јпг са засићеним раствором шећера и копрокултура на 27°C током 7 дана (види касније)) и узимањем узорака пуне крви у

„вакутајнер“ епрувете са антикоагулансом ради одређивања вредности хематокрита помоћу хематолошког аналајзера. Хематолошке анализе су урађене у Научном институту за ветеринарство „Нови Сад“.

Овце су прегледане FAMACHA® дијаграмом тако што је свака прегледана овца добро фиксирана да не помера главу, затим је доњи очни капак повучен на доле како би се изложила коњуктива и проценила њена боја. Тада је боја коњуктиве ока упоређена са бојама на дијаграму који се налази у другој руци прегледача на следећи начин: оцена 1=црвена боја, нема анемије; оцена 2=бледо црвена боја, нема анемије; оцена 3=розе боја, умерена анемија; оцена 4=бледо розе боја, анемија; оцена 5=бела боја, тешка анемија (van Wyk и Bath, 2002).



Слика 11: Изглед FAMACHA® дијаграма (лево) и испитивање клиничке анемије овце у теренским условима (десно), ориг.

Помоћу ANOVA теста је испитан утицај примене антихелминтика на промену просечне FAMACHA® оцено. Због облика дистрибуције (искошеност и закривљеност) који је указивао да у оба посматрања подаци одступају од нормалне расподеле, урађен је Левенов тест да би се испитала једнакост између њихових варијанси (Petrie и Watson, 2006), што је предуслов за извођење ANOVA теста. Ради утврђивања повезаности између хематокрита, броја јаја и појединачних FAMACHA® оцена за податке добијене у посматрањима током 2014. године, урађена је корелација по Пирсону (израчунат је коефицијент корелације r и одређена је p вредност), а у случају да вредности посматраних променљивих немају нормалну расподелу Спирманова корелација вредности рангова. Да би се подаци за број јаја приближили нормалној расподели, ове вредности су прво трансформисане у логаритам (база 10). На вредност броја јаја (FEC) је додат број 1,5 и затим је извршено логаритмовање MS Excell-у 2007 (Pivoto и сар, 2014). Статистичке операције и графички приказ података су урађени у програмима MS Excell 2007, Statistica 13, Statgraphics Centurion XVI.I. Све калкулације су урађене на нивоу значајности 95% ($p \leq 0,05$). Корелација је интерпретирана по Petz-у (2007).

4.1.3. Паразитолошки преглед

4.1.3.1. Бројање паразитских елемената у измету оваца

За бројање јаја желудачно-цревних стронгилида најчешће је коришћена модификована метода по McMaster-у, са различитим нивоима аналитичке осетљивости (MAFF, 1986). Поред ове методе, коришћен је и MINI-FLOTAC (Cringoli и сар, 2013).

У огледима су најчешће коришћене процедуре са аналитичком осетљивошћу од 50 јпг, 25 јпг и 10 јпг; детаљи примењене методологије ће бити описани овде и неће бити понављања описа метода у другим поглављима ове докторске дисертације.

Процедура за бројање по McMaster-у аналитичке осетљивости 50 јпг (MAFF, 1986):

1. Измерити 3 грама измета на прецизној ваги и ставити измет у пластичну чашу запремине око 100 мл;
2. Додати 42 мл раствора за флотацију;
3. Добро хомогенизовати (пластичном кашиком, шпатулом или уз помоћ хомогенизатора);
4. Процедити кроз цедиљку или паразитолошко сито (овде је коришћена пластична цедиљка за чај) да се одстрани крупна биљна влакна. Бацити садржај који је остао на цедиљки;
5. Чистом пластичном кашиком промешати суспензију покретима горе-доле, одмах затим аспирирати суспензију (овде су коришћени пластични дводелни шприцеви од 2 мл, могу се користити Пастерове пипете и сл.) и напунити једно поље коморице пазећи да не уђе мехурић ваздуха;
6. Промешати поново и напунити друго поље;
7. Сачекати 10 минута и бројати под микроскопом паразитске елементе испод зелене мрежице у оба поља при увећању од 100 пута;
8. Један избројани паразитски елемент је еквивалент са 50 истих по граму измета.

Процедура за бројање по McMaster-у аналитичке осетљивости 25 јпг (Zajac и Conboy, 2006):

1. Измерити 4 грама измета прецизној ваги и ставити измет у пластичну чашу запремине око 100 мл;
2. Додати 26 мл раствора за флотацију;
3. Кораци 3-7 су исти као за претходно описани метод;
4. Један избројани паразитски елемент је еквивалент са 25 истих по граму измета.

Процедура за бројање по McMaster-у аналитичке осетљивости 10 јпг
(MAFF, 1986; Cringoli и сар, 2004)

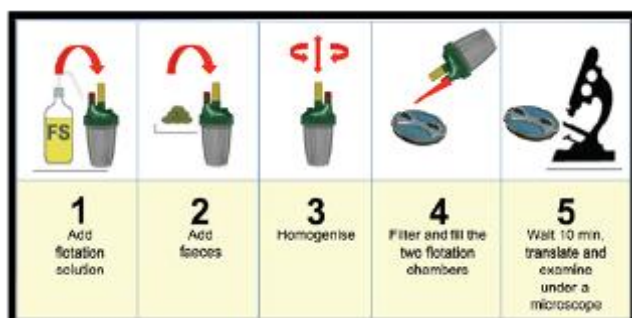
1. Измерити 4 грама измета прецизној ваги и ставити измет у пластичну чашу запремине око 100 мл;
2. Разредити водом из чесме у односу 1:10, хомогенизовати и процедити као у корацима 3 и 4 описаним у првој процедури;
3. Промешати суспензију и пластичним шприцем додати 10 мл узорка у епрувете;
4. Центрифугирати 2 минута на 1500 обртаја у минуту;
5. Одлити раствор изнад талога;
6. Талог промешати дрвеним штапићем, додати раствор за флотацију до претходног нивоа, палцем затворити епрувету и промешати суспензију неколико пута пажљивим окретањем горе-доле;
7. Одмах затим напунити поље коморице помоћу пластичног дводелног шприца запремине 2 мл (поново промешати суспензију пре пуњења другог поља);
8. Исто као корак 7 описан у првој процедури;
9. Један избројани паразитски елемент је еквивалент са 10 истих по граму измета.

Без обзира на то која од описаних McMaster метода је коришћена у огледима, као раствор за флотацију је коришћен засићени раствор шећера по Sheater-у, специфичне тежине 1,27 (Zajac и Conboy, 2006) зато што је у претходним огледима других аутора показао да је одличан медијум за флотирање јаја желудачно-цревних стронгилида оваца (Cringoli и сар, 2004).

Процедура за бројање MINI-FLOTAC техником аналитичке осетљивости 5 јпг
(Cringoli и сар, 2013; упутство за употребу MINI-FLOTAC уређаја)

1. Додати 45 мл раствора за флотацију у контејнер FILL-FLOTAC уређаја;
2. Измерити 5 грама измета на помоћу лабораторијске ваге и убацити у контејнер;
3. Хомогенизовати добро помоћу посебно направљене ручице;
4. Сипати суспензију у поља MINI-FLOTAC уређаја;
5. Сачекати 10 минута, окренути кључ на да се ротира диск за читање и прегледати под микроскопом на увећању 100 пута.
6. Један избројани паразитски елемент је еквивалент са 5 истих по граму измета.

Када је у питању MINI-FLOTAC техника, за флотацију је коришћен засићен раствор NaCl специфичне тежине 1,2 по препоруци изумитеља (Maria Paola Aurelli, лична комуникација).



Слика 12. Редослед корака при употреби MINI-FLOTAC апарата и FILL-FLOTAC уређаја (по Cringoli и сар, 2013).

Без обзира на то који је метод за квантификацију паразитских елемената употребљен, резултати бројања за сваку појединачну овцу уписивани су у посебно направљен формулар (слика 12) где се посебно бележе морфолошки различити паразитски елементи који се дијагностикују методом флотације и/или седиментације (нпр. ооците протозоа из рода *Eimeria*, јаја стронгилидног типа, јаја *Nematodirus spp.*, јаја великог и малог метиља и сл.).

Kvantifikacija parazitskih elemenata u fecesu ovaca i koza metodom flotacije

Rastvor za flotaciju (SPG):	McMaster komorica (Se): <ul style="list-style-type: none"> 2 polja 3 polja 	Ispitivana površina McMaster (ml): 0,15 0,3 0,5 1
-----------------------------	--	---

Vrsta životinje: _____ Broj uzorka: _____ Datum: _____

NALAZ:

Strongilidna jaja	S. papillosus	Nematodirus spp.	Trichouris spp.	Moniezia spp.	Dicrocoelium destititum	Fasciola hepatica	Eimeria spp.	Ostalo

Слика 12. Изглед посебно направљени формулар за бележење резултата копролошког прегледа методама квантификације, ориг.

4.1.3.2 Постављање копрокултуре и идентификација инфективних ларвица

Инфективне ларвице желудачно-цревних стронгилида оваца су идентификоване након култивације измета. Процедуре су потпуно исте када су у питању појединачни или збирни узорци, па то неће бити посебно истицано.

Копрокултура на 27°C током 7 дана (Zajac и Conboy, 2006)

1. Опрати чисту стаклену посуду одговарајуће запремине (коришћена је обична стаклена тегла од пола литра)
2. Направити збирни узорак измета мерењем једнаке количине појединачних узорака из испитиване групе оваца помоћу аналитичке ваге
3. Ако су узорци били свежи, онда је измет довољно влажан и вода се не мора додавати. У случају да је количина суве материје у измету велика (мрви се) додаје се толико воде да култура буде влажна, али не превише
4. Покрити посуду алуминијумском фолијом и избушити неколико рупица помоћу игле
5. Ставити културу у термостат на температуру 27°C током 7 дана
6. Свакодневно прегледати копрокултуру, мешати је, а по потреби и влажити водом
7. Седмог дана урадити „Берманизацију“ ради добијања инфективних ларвица.

Копрокултура на 25°C током 10 дана без мешања (слика 13)(Симин и сар, 2012)

1. Измерити 10 грама измета, ставити у чисту бочицу за узорковање урина
2. Помешати са суспензијом која садржи одговарајућу дозу хламидоспора *D. fragrans* подешену според броја ЈПГ посматраног узорка.
3. После мешања културе, бочицу прекрити газом која је осигурана гумицом, а на дну бочице за урин избушити неколико рупа.
4. Затим културу у бочици за урин преврнути у пластичну чашу запремине 200 милилитара у коју је претходно додато 10 милилитара дестиловане воде. На овај начин обезбеђена је потребна влага током периода инкубације.
5. Копрокултуру убацити у термостат на 25°C на 10 дана. Током овог периода, културу прегледати неколико пута само ради провере нивоа воде у чаши (резервоару).

Слика 13. Копрокултура без мешања, ориг.



После завршене копрокултуре, потребно је применити технике за екстракцију инфективних ларвица из култивисаног измета, да би се могле прегледати и идентификовати. У ту сврху, описана су два коришћена метода за екстракцију (седиментацију) ларвица. Такође, описана је и процедура бројања инфективних ларвица у суспензији, јер се подаци добијени квантификацијом ларвица користе у формулама за израчунавање ефикасности нематофагне гљиве *D. fragrans*.

Седиментација ларвица модификованом методом
по Baermann-у (Zajac и Conboy, 2006)

1. Култивисани измет замотати у комад газе величине 20 x 20 cm
2. Гумицом завезати газу изнад узорка
3. Кроз слободни крај газе провући дрвени штапић (висину подесити според жељеног нивоа)
4. Узорак убацити у пластичну чашу запремине 100 ml која има шупљи сталак
5. Додати топле воде (око 40-ак °C) да измет буде уроњен
6. Оставити да стоји преко ноћи на собној температури како би се ларвице исталожиле на дно резервоарчића пластичне чаше
7. Након 24 сата, бацити измет завијен у газу, и аспирирати воду из чаше помоћу пластичне бризгалице водећи рачуна да се талог не аспирира (боље је оставити 1-2 ml течности изнад талога)
8. Ларвице пребацити у епрувету запремине 12 ml или у пластични фалкон запремине 50 ml, напунити физиолошким раствором, и чувати у на 4°C до употребе.

Седиментација ларвица методом по Roberts-y и O'Sullivan-y (1950)

1. Измет је претходно култивисан у стакленој тегли како је описано
2. Ларвице које се евентуално налазе у кондензату на зидовима тегле испрати дестилованом водом
3. Ако ларвица на зидовима нема, потребно је теглу напунити топлем водом до самог врха тако да се течност скоро прелива
4. Затим поклопити теглу стакленом Петри кутијом пречника 10 или 15 cm и све заједно брзим покретом окренути тако да се суспензија не проспе
5. У Петри кутију додати топле воде до нивоа од око 1 cm и оставити да стоји преко ноћи
6. Следећег дана, аспирирати ларвице које су мигрирале из култивисаног измета у Петри кутију помоћу бризгалице или аутоматске пипете
7. Исто као корак 8 описан у претходној процедури.

Да би се урадила идентификација ларвица, оне се претходно морају имобилисати. То је урађено пребацивањем капи суспензије ларвица на предметно стакло и додавањем мање капи Луголовог раствора који убије ларвице и обоји их у тамно жуто. На основу морфологије и морфометрије, инфективне ларвице су препознате помоћу расположивих кључева за идентификацију (MAFF, 1986; Taylor и сар, 2007; Zajac и Conboy, 2006; van Wyk и сар, 2004; van Wyk и Mayhew, 2013). При томе, посебна идентификација родова *Oesophagostomum* и *Chabertia* није урађена, него су инфективне ларвице бележене као један ентитет *Oesophagostomum/Chabertia*.

4.1.3.3. Налаз и идентификација одраслих паразита добијених *post mortem*

Током израде докторске дисертације четири пута су органи дигестивног тракта анализирани ради проналажења желудачно-цревних стронгида. То је спровођено само у случајевима када је било планирано клање оваца у комерцијалне сврхе или након обдукције угинулих оваца. Када су органи испитивани, циљ је био налаз одраслих нематода и идентификација врста које паразитирају на имању. Квантификација различитих развојних облика паразита није урађена.

Приликом узимања органа дигестивног тракта за паразитолошку претрагу су одмах након евисцерације постављене лигатуре да се садржај одређених партија не би помешао. Тако је посебно лигирано сириште, танка и дебела црева, и сваки део је испитан посебно (слика 14). За проналажење одраслих паразита коришћен је протокол добијен комбинацијом стандардних метода претраге органа дигестивног тракта (Robertson и Elliott, 1966; McKenna, 2008; Bowman, 2009; Taylor и сар, 2007). Испирање органа дигестивног тракта је урађено на следећи начин:

1. **Сириште** је отворено маказама дуж велике кривине и слузокожа са садржајем је изложена адспекцији. Визуелно је проверено присуство макроскопски видљивих паразита. Затим је садржај испран у пластичну кофу запремине 10 литара са 2-4 литра воде. Мукоза није остругана и дигестија мукозе није урађена. Садржај кофе у коме се налазе паразити је филтриран кроз сито

промера 250 микрона. Сав садржај који је остао на ситу је спирају у чисту кофу, и досута је вода до познате запремине а затим је додат концентровани формалин да би се добио 5% раствор у коме су паразити чувани до прегледа.

2. **Танка црева** су ослобођена од мезентеријума, нису отварана. Илеум је пресечен попречно на илео-цекалном споју и у лумен је насута 2-4 литра воде из чесме (по потреби и више). Други крај црева (дуоденални отвор) је убачен у пластичну кофу од 10 литара. Између палца и кажипрста садржај је “цеђен” према дуоденуму да се исперу сви паразити. Процедура испирања је поновљена још једном. Садржај кофе је поступно сипан кроз сито промера 250 микрометара. Задржани паразити су спрани у чисту кофу, и садржај је формализован на начин како је описано за сириште.
3. **Дебела црева** су испрана у пластичну кофу запремине 10 литара, па је тако добијени садржај даље постепено испран под млазом воде кроз веће сито (обична пластична цедиљка за чај/млеко већег промера). Сви паразити који су макроскопски уочени у ситу су прикупљени пинцетом и сачувани у стакленој боци у 5% формалину до прегледа.

Како црева углавном нису отварана током прегледа органа дигестивног тракта (осим дела танких црева једном приликом), сириште је орган чија је слузница најчешће била доступна адспекцији. После испирања садржаја и евентуално присутних паразита, слузнице испитиваних органа су прегледане да би се уочиле макроскопски видљиве патолошке промене које могу да прате паразитски гастроентеритис.



Слика 14. Обдукција овце и преглед органа у лабораторији, ориг.

Одрасле стронгилиде су идентификоване на основу морфолошких карактеристика. Неколико милилитара раствора са сачуваним паразитима је пресуто у мању стаклену Петри кутију. Велики и голим оком добро видљиви паразити су директно вађени помоћу игле или fine пинцете а остатак је посматран на увећању од 20-40x под стереомикроскопом ради проналажења малих нематода (род *Trichostrongylus*). Паразити су опрани у физиолошком раствору, стављени на микроскопску предметницу, просветљени у лактофенолу и гледани под микроскопом на увећању 4x10, 10x10, 25x10 или 40x10, у зависности од расположивих објектива. Помоћу тринокуларних микроскопа су начињене многобројне фотографије (MOTIC BA-210, Motic (Xiamen) Electric Group Co., Ltd, Кина; Leica DMLS, Leica Microsystems, Wetzlar, Немачка).

На одраслим хелминтима су посматране структуре карактеристичне за поједине родове. Како се на основу морфологије женки не може лако одредити врста, оне су идентификоване до нивоа рода на основу величине и морфологије. За идентификацију желудачно-цревних стронгилида до нивоа врсте су коришћени мужјаци где је посматрана морфологија копулаторне бурзе са распоредом режњева, изглед и величина спикула, присуство губернакулума. Идентификација стронгилида је урађена помоћу расположивих кључева (Ransom, 1911; Lapage, 1956; MAAF, 1986; Taylor и сар, 2007).

4.1.4. Утврђивање сезонске динамике и интензитета инвазије желудачно-цревних стронгилида

За приказ сезонске динамике излучивања јаја желудачно-цревних стронгилида је коришћен копролошки налаз када је преглед урађен у групи коју чини најмање 10 оваца, док појединачни спорадични прегледи нису узети у обзир. Посебно је приказано излучивање јаја трихостронгилида (рачунајући и негативне, али без јаја *S. papillosus* и *Trichuris spp.*) и рода *Nematodirus*.

На основу резултата идентификације инфективних ларвица након копрокултуре је посебно приказана сезонска динамика родова/врста који инвадирају овце на газдинству. Како узорци нису узимани по тачно утврђеним временским интервалима током календарске године већ периодично током трајања пашне сезоне, приказ је направљен за период зиме, пролећа, лета и јесени и представљен табеларно и графички.

Интензитет инвазије желудачно-цревним стронгилидама оваца је утврђен на основу водича који је направљен комбиновањем података о броју јаја по граму измета и налазу родова/врста стронгилида након идентификације инфективних ларвица. За прављење водича су узете препоруке Abbott-а и сарадника (2009) и Taylor-а и сарадника (2007). Како се ова два појединачна водича донекле разликују, из сваког понаособ су изабрани одређени критеријуми за одређивање интензитета инвазије (Табела 5).

Табела 5. Водич за интерпретацију интензитета инвазије оваца желудачно-цревним стронгилидама.

Род/врста стронгилида	Број јаја по граму измета(ЈПГ)			Референца
	Низак	Умерен	Висок	
Више врста стронгилида (нема <i>H. contortus</i>)	< 250	250-750	> 750	Abbott и сар. (2009)
Више врста стронгилида (има <i>H. contortus</i>)	< 500	500-1500	> 1500	Abbott и сар. (2009)
<i>Haemonchus contortus</i>	< 500	1000-5000	> 5000	Abbott и сар.(2009)
<i>Trichostrongylus spp.</i>	100-500	500-2000	> 2000	Taylor и сар. (2007)
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	50-200	200-2000	> 2000	Taylor и сар. (2007)
<i>Nematodirus spp.</i>	50-100	100-600	> 600	Taylor и сар. (2007)
<i>Strongyloides</i>	-	-	10000	Taylor и сар. (2007)

Интензитет инвазије паразитима оваца је утврђен појединачно за желудачно-цревне стронгилиде (без *S. papillosus* и *Trichuris spp.*) и *Nematodirus spp.* Током различитих годишњих доба прегледан је различит број оваца.

4.2. Конструкција ама за скупљање измета оваца

За извођење теста копрокултуре са *D. flagrans* потребно најмање 200 грама измета од сваке овце (дизајн огледа видети даље у тексту). Узорковањем измета директно из ректума се најчешће не може узети наведена грамажа, а није ни практично проводити време поред животиње док се не сакупи потребна количина узорка. Да би превазишли овај проблем, истраживачи су прибегавали разним техникама прикупљања измета, од постављања геријатријске пелене на животиње (da Silva и сар, 2009) до употребе посебних амова за прикупљање измета (Sankhyan и сар, 1999). Како се показало да геријатријска пелена није одговарајући начин за скупљање узорка, и због недостатка било каквих амова на домаћем тржишту, након анализе доступне стране литературе, приступљено је дизајнирању и мануелној изради одговарајућег ама за прикупљање измета. Амови су дизајнирани тако да садрже минималан број каишева и копчи, да су подесиви за животиње различите величине и телесне кондиције, да је материјал безбедан по животињу, јефтин као и да се лако може поправити ако дође до оштећења или кидања. У сврху израде ама, употребљена је синтетска трака ширине 4 цм (за основу ама постављену дуж леђа овце) и ширине 2,5 цм (за огрлицу и каишеве за фиксирање кесе за скупљање измета), пластичне шнале за регулисање дужине, пластичне копче, пластична дугмад, јак најлонски конач и платнена кеса сашивена за скупљање измета (слика 15).



Слика 15. Материјал коришћен за шивење ама, ориг.

4.3. Утврђивање присуства резистенције на ивермектин

4.3.1. Почетна испитивања ефикасности ивермектина против желудачно-цревних стронгилида урађена 2012. године

Прва истраживања ефикасности ивермектина су започела на имању током 2012. године, јер је претходне (2011.) године месец дана након дехелминтизације једним од препарата ивермектина (Alfamec 1%®, Alfasan, Холандија) власник приметио да су овце и даље

слабије кондиције и да не напредују упркос терапији. Нажалост, контроле ефикасности ивермектина није било те године али ни детаљнијих испитивања других потезијалних узрока слабе кондиције. Најзад, после детаљног проучавања литературе и пажљивог планирања, у јулу 2012. године постављен је и први тест редукције јаја (енглески: Faecal Egg Count Reduction Test или FECRT) ради провере ефикасности ивермектина.

FECRT је урађен према упутствима Светског удружења за унапређење ветеринарске паразитологије (WAAVP; Coles и сар, 1992). Урађена је предселекција оваца да би се бројањем јаја задовољио услов да овце које су укључене у оглед морају имати минимум 150 јпг (Coles и сар, 1992). Затим су формиране две групе од по 15 одраслих оваца (старијих од две године), при чему је једна група третирана ивермектином а друга група није и служила је за контролу. „Нултог“ дана су овцама из обе групе узети појединачно узорци измета директно из ректума, паковани у пластичне бочице, обележени и транспортовани у лабораторију. Овце из огледне групе су мерене појединачно на сточној ваги, и свакој је на основу индивидуалне телесне тежине супкутано апликован ињекциони раствор ивермектина (Ivermectin-S®, Ветеринарски завод Суботица, Србија) у дози препорученој од стране произвођача (0, 2 mg/kg ТМ). Четрнаестог дана, узорци измета су поново узети од свих оваца, да би се пребројала јаја стронгилида. Квантификација јаја паразита је урађена модификованом методом по McMaster-у аналитичке осетљивости 10 јпг (описано раније у овом поглављу). Јаја стронгилида и *Nematodirus* spp. су бројана посебно.

Анализом варијансе (АНОВА) је проверена хомогеност група у односу на ниво јаја пре почетка FECR теста (0.дан). У ту сврху су прво појединачне вредност броја јаја трансформисане у логаритам (база 10) да би се подаци приближили нормалној расподели. На вредност броја јаја (FEC) је додат број 1,5, и затим је извршено логаритмовање у MS Excell-у 2007 (Pivoto и сар, 2014). Затим су све вредности поређене у статистичком програму Statgraphics Centurion XVI.I помоћу АНОВА теста.

Редукција јаја је израчуната само за стронгилиде (не за *Nematodirus* spp.), на следећи начин:

1. помоћу формуле Coles-а и сарадника (1992):

$$R (\%) = 100 (X_t / X_c)$$

2. помоћу формуле коју је дефинисао McKenna (2006):

$$R (\%) = 100(1 - T_2/T_1),$$

где је R проценат редукције јаја (односно ефикасност лека), X_t просечна вредност јпг испитиване групе оваца 10-14 дана после дехелминтизације, а X_c просечна вредност јпг контролне групе оваца 10-14 дана после дехелминтизације (Coles и сар, 1992), односно T_1 и T_2 просечан број јаја у Т групи пре и после лечења (McKenna, 2006).

Поред процента редукције јаја, потребно је израчунати и 95 % интервале поверења да би се тај податак искористио за доношење одлуке о присуству резистенције. То је урађено методом по Wurston-у и Martin-у применом RESO програма (доступно на <http://sydney.edu.au/vetscience/sheepwormcontrol/software/index.html>) за обе формуле.

Налази су тумачени у складу са препорукама WAAVP: резистенција (P) постоји ако је редукција јаја <95% и доњи интервал поверења <90%; ако је испуњен само један од критеријума поставља се сумња на резистенцију (CP). Ако је редукција јаја већа од 95%, сматра се да је популација стронгилида осетљива на ипитивани антихелминтик (O). Наведена правила за интерпретацију резултата су наведена овде и важе за сва извршена испитивања ефикасности антипаразитета помоћу теста редукције јаја.

За поређење популације ларвица између група 0-ог дана је коришћен хи-квадрат тест. Урађено је и поређење популације ларвица унутар контролне групе током времена (3 посматрања). У случај постојања статистички значајне разлике, проценат појединих родова је тад појединачно упоређен помоћу хи-квадрат теста у оквиру групе да се утврди које се од њих разликује. Калкулација је урађена у програму Quantitative Parasitology 3.0 (Rózsa и сар, 2000).

4.3.2. Испитивање ефикасности ивермектина против желудачно-цревних стронгилида током 2013. године

4.3.2.1. Испитивање ефикасности ивермектина против *Nematodirus* spp.

Проучавањем литературе о дијагностици резистенције помоћу FECR теста, пронађен је занимљив рад алжирских и француских паразитолога (Bentounsi и сар, 2007) који говори о детекцији резистенције на антихелминтике код оваца које имају низак ниво инфекције, тј. мањи броја јаја од препоручених 150 по граму измета (Coles и сар, 1992). У оваквим случајевима, детекција резистенције је заснована на двократној апликацији лека у размаку од десет дана, при чему се узорци измета за бројање јаја и рачунање ефикасности узимају нултог и двадесетог дана (Bentounsi и сар, 2007). У њиховом раду, примењена методологија је била успешна у проналажењу изолата *Nematodirus* spp. резистентног на бензимидазоле.

Зато је овај рад послужио за израду новог протокола како би се проверили претходни налази везани за сумњу на постојање резистенције код *Nematodirus* spp. на ивермектин на посматраном имању. Током 2013. године је постављен нови оглед. Половином марта је узоркован измет из ректума 45 одраслих оваца и пребројана јаја методом по McMaster-у аналитичке осетљивости 10 јпг. Од 45 оваца, код 38 је забележено присуство јаја *Nematodirus* spp. у распону од 10-190 јпг. На основу резултата предселекције, овце су подељене у три групе у зависности од нивоа јпг:

- група 1 са ниском вредности јпг (0-50); укупно 26 јединки, од којих је 18 укључено у оглед;
- група 2 са средњом вредности јпг (51-100); укупно 6 јединки, све укључене у оглед;
- група 3 са високом вредности јпг (>100); укупно 6 јединки, све укључене у оглед.

Насумичним распоређивањем, из сваке групе је једнак број оваца додељен огледној или контролној групи. Седам дана након предселекције је започео оглед. Овцама из обе групе узети су појединачно узорци измета директно из ректума, паковани у пластичне бочице, обележени и транспортовани у лабораторију. Све овце из огледне групе су појединачно измерене на сточној ваги ради тачног дозирања лека, и третиране супкутано ињекционим раствором ивермектина (Ivermectin-S®, Ветеринарски завод Суботица, Србија) у дози препорученој од стране произвођача од 0, 2 mg/kg ТМ. Пре употребе је прочитана прескрипција препарата где је потврђена индикација против *Nematodirus* spp. Десетог дана,

овцама из огледне групе је поново апликован ивермектин. Двадесетог дана, овцама из обе групе су поново узети појединачни узорци измета директно из ректума, ради бројања јаја и рачунања ефикасности ивермектина против *Nematodirus* spp. Посебан метод копрокултуре за идентификацију инфективних ларвица *Nematodirus* spp. није урађен. За идентификацију стронгилида, збирни узорци измета су култивисани на 27°C током 7 дана и инфективне ларве у свакој групи су идентификоване до нивоа рода уз помоћ напред наведених кључева.

Јаја стронгилида и *Nematodirus* spp. су бројана и бележена посебно у одговарајући формулар. И овога пута је коришћена већ поменућа формула по Coles –у и сарадницима (1992), а за интервале поверења је употребљен RESO програм. Ефикасност ивермектина је израчуната и за стронгилиде и за *Nematodirus* spp. На дан апликације лека, код једне овце из огледне групе, претходно позитивне у предселекцији, нису пронађена јаја после копролошког прегледа, те је искључена из калкулације ефикасности лека. Тако је 14 оваца из огледне групе учествовало у огледу.

4.3.2.2. Испитивање ефикасности ивермектина против осталих стронгилида

На газдинству су за дехелмитизацију оваца коришћени различити комерцијални препарати ивермектина регистровани у нашој земљи. Раније је коришћен Iverktin® (Pliva, Хрватска), затим су се смењивали Ivermektin-S® (Ветеринарски завод Суботица, Србија) и Alfamec 1%® (Alfasan, Холандија). Имајући у виду да је лош резултат након примене Alfamec 1%® остао неистражен, и да различити препарати ивермектина могу показати неједнаку ефикасност против стронгилида (нпр. Bentounsi и сар, 2009), донета је одлука да се тест редукције јаја понови али уз тестирање неколико различитих препарата ивермектина доступних на тржишту у Србији 2013. године. Тако је посећен сајт Агенције за лекове и медицинска средства Србије (АЛИМС) (<http://www.alims.gov.rs/ciril/veterinarski-lekovi/pretrazivanje-veterinarskih-lekova/>) и направљен је списак регистрованих препарата за 2013. годину.

Регистровани су следећи препарати:

1. **Назив лека:** Alfamec 1% **Генерички назив:** ivermektin **Врста решења:** OBNOVA **Режим издавања:** NRV **Облик и паковање:** rastvor za injekciju; 10mg/mL; bo **Број решења:** 288/2009/1400 **Датум решења:** 16.11.2009. **Датум истицања решења:** 16.11.2014. **Произвођач:** ALFASAN INTERNATIONAL B.V. / **Носилац одобрења:** FARMANIMA D.O.O.
2. **Назив лека:** Biomec **Генерички назив:** ivermektin **Врста решења:** REGISTRACIJA **Режим издавања:** NRV **Облик и паковање:** rastvor za injekciju; 10mg/mL; bo **Број решења:** 323-01-239-10-001 **Датум решења:** 19.06.2012. **Датум истицања решења:** 19.06.2017. **Произвођач:** BIOVETA, A. S. / **Носилац одобрења:** PROVET D.O.O.
3. **Назив лека:** Iveripra-I **Генерички назив:** ivermektin **Врста решења:** OBNOVA **Режим издавања:** NRV **Облик и паковање:** rastvor za injekciju; 10mg/mL; bo **Број решења:** 262/2007/1400 **Датум решења:** 17.09.2007. **Датум истицања решења:** 17.09.2012. **Произвођач:** LABORATORIOS HIPRA, S.A. / **Носилац одобрења:** FISH CORP. 2000 D.O.O.
4. **Назив лека:** Ivermectine 1% **Генерички назив:** ivermektin **Врста решења:** REGISTRACIJA **Режим издавања:** NRV **Облик и паковање:** rastvor za injekciju; 10mg/mL; bo **Број решења:** 540/2010/1400 **Датум решења:** 05.10.2010. **Датум истицања решења:** 05.10.2015. **Произвођач:** INOUKO GENERICS / **Носилац одобрења:** FARMANIMA D.O.O.

5. **Назив лека:** Neomectin **Генерички назив:** ivermektin **Врста решења:** OBNOVA **Режим издавања:** NRV **Облик и паковање:** rastvor za injekciju; 10mg/mL; bo **Број решења:** 212/2010/1400 **Датум решења:** 09.04.2010. **Датум истицања решења:** 09.04.2015. **Произвођач:** FM PHARM D.O.O. / **Носилац одобрења:** FM PHARM D.O.O.
6. **Назив лека:** Pandex 1% **Генерички назив:** ivermektin **Врста решења:** REGISTRACIJA **Режим издавања:** NRV **Облик и паковање:** rastvor za injekciju; 10mg/mL; bo **Број решења:** 41/2010/1400 **Датум решења:** 10.02.2010. **Датум истицања решења:** 10.02.2015. **Произвођач:** BIOVET JSC / **Носилац одобрења:** FARMANIMA D.O.O.
7. **Назив лека:** Promectine **Генерички назив:** ivermektin **Врста решења:** REGISTRACIJA **Режим издавања:** NRV **Облик и паковање:** rastvor za injekciju; 10mg/mL; bo **Број решења:** 48/2009/1400 **Датум решења:** 16.03.2009. **Датум истицања решења:** 16.03.2014. **Произвођач:** INVESA INDUSTRIAL VETERINARIA S.A. / **Носилац одобрења:** VETMEDIC D.O.O.

Препарат Ivermektin-S® (Ветеринарски завод Суботица, Србија) није био на списку регистрованих формулација ивермектина на сајту АЛИМС-а, али је телефонским разговором произвођач потврдио да је препарат ипак регистрован (шифра: ATCVet: QP54AA01). Додатне провере у АЛИМС-у нису спроведене. Крајњи закључак је да је у 2013. години на тржишту Србије регистровано 8 инјекционих препарата ивермектина, од којих само један (Биомес®, BIOVETA, A. S., Чешка) није регистрован за примену на овцама у моменту истраживања.

Тако је од марта до маја 2013, пет тестова редукције јаја урађено ради процене ефикасности пет инјекционих препарата ивермектина:

1. Ivermektin-S® (Ветеринарски завод Суботица, Србија)
2. Alfamec 1%® (Alfasan, Холандија)
3. Neomectin® (FM Pharm D.O.O., Србија)
4. Promectine® (Invesa Industrial Veterinaria S.A., Шпанија)
5. Pandex 1%® (Biovet JSC, Бугарска)

Овце из запата су биране насумично, али је за сваку овцу урађена предселекција у смислу да је резултат копролошког прегледа урађеног пре FECR теста морао показати да је број јаја најмање 150 јпг. Формирано је пет огледних група током наведеног периода, али не истовремено. Свака огледна (Т) група бројала је по 10 оваца. Није било контролне групе. Све животиње из групе су пре апликације лека нултог дана појединачно измерене на сточној ваги, и спрам индивидуалне тежине им је поткожно апликован један од испитиваних препарата ивермектина по препорученој дози произвођача од 0, 2 mg/kg ТМ. За калкулацију и поређење ефикасности Ivermektin-S® са другим препаратима је насумично изабрано 10 оваца из претходног огледа са *Nematodirus* spp. Једина разлика у односу на остале препарате је што су овце овим препаратом третиране двократно у размаку од 10 дана.

За квантификацију јаја изабрана је модификована метода по McMaster-у (осетљивост=10 јпг), при чему су јаја стронгилида и *Nematodirus* spp. бројана посебно. Збирни узорци измета су култивисани (на 27°C током 7 дана) и ларве стронгилида у свакој групи су идентификоване до нивоа рода.

Редукција јаја је израчуната формулом:

$$R (\%) = 100(1-T_2/T_1),$$

где је T_1 и T_2 просечан број јаја у Т групи пре и после лечења (McKenna, 2006). Методом по Wurston-у и Martin-у применом RESO програма су израчунати 95% интервали поверења (McKenna, 2013). Налази су тумачени у складу са поменутих препорукама WAAVP.

Како ефикасност различитих препарата није испитивана истовремено и није било предселекције да би се уједначио ниво јаја у различитим групама, анализом варијансе (АНОВА) је проверена хомогеност група у односу на ниво јаја пре почетка FECR теста (0. дан). У ту сврху су прво појединачне вредности броја јаја трансформисане у логаритам (база 10) да би се подаци приближили нормалној расподели. На вредност броја јаја (FEC) је додат број 1,5 и затим је извршено логаритмовање MS Excell-у 2007 (Pivoto и сар, 2014). Затим су све вредности поређене у статистичком програму Statgraphics Centurion XVI.I помоћу АНОВА теста.

Помоћу хи-квадрат теста је испитано да ли постоји статистички значајна разлика у ефикасности ивермектина између огледних група. У случају да је за нека посматрања очекивана вредност за хи-квадрат тест била мања од 5, уместо њега је онда коришћен Фишеров тест поузданости (Petrie и Watson, 2006). У случају постојања статистички значајне разлике у ефикасности лека, вредности добијене за сваку испитивану групу су тад појединачно упоређене помоћу хи-квадрат теста да се утврди које се од њих разликују. Калкулација је урађена у програму Quantitative Parasitology 3.0 (Rosza и сар, 2000). Све калкулације су урађене на нивоу значајности 95% ($p \leq 0,05$).

4.3.3. Испитивање ефикасности ивермектина против желудачно-цревних стронгилида током 2015. године

4.3.3.1. Мај 2015

За проверу ефикасности ивермектина у мају 2015. године је истовремено урађено четири FECR теста. Пет дана пре третмана (Д-5) је 67 оваца насумице изабрано из запата и узоркован им је измет из ректума ради утврђивања броја јаја. Све животиње са бројем јаја већим од 150 јпг су подељене у три групе на основу броја јаја:

- група 1 (150-500 јпг),
- група 2 (501-1000 јпг) и
- група 3 (>1000 јпг),

и затим насумично расподељене у 4 огледне групе (T_1 - T_4) и једну контролну (К) са једнаким бројем оваца у свим групама ($n=10$), осим у T_4 ($n=9$). „Нултог“ (Д0) и 14. дана (Д14), узорковање измета из ректума је поновљено свим овцама ради бројања јаја. Све животиње су пре апликације антипаразитета нултог дана појединачно измерене на сточној ваги, и спрам индивидуалне тежине им је поткожно апликован Promectine® (Invesa Industrial Veterinaria S.A., Шпанија) по препорученој дози произвођача од 0, 2 mg/kg ТМ. Бочица препарата је отворена на дан апликације овцама. Квалитет препарата је проверен тако што је од заступника, односно увозника, добијен Сертификат анализе за целу серију препарата издат од стране АЛИМС-а, по коме „узорак одговара прописаним захтевима“.

За квантификацију јаја у предселекцији и током трајања огледа је коришћен Mini-FLOTAC (Cringoli и сар, 2013) (осетљивост=5 јпг, јаја стронгилида и *Nematodirus* spp. бројана посебно). Збирни узорци измета су култивисани (на 27°C током 7 дана) и ларве стронгилида у свакој групи су идентификоване до нивоа рода како је описано.

Инфективне ларвице из T₄ нису идентификоване, тако да је за ову групу израчуната само редукција јаја, а није израчуната ефикасност ивермектина против појединих родова стронгилида.

За израчунавање редукције јаја је поново употребљена формула Coles-а и сарадника (1992):

$$R (\%) = 100 (X_t / X_c)$$

где је R проценат редукције јаја, X_t просечна вредност јпг испитиване групе оваца 10-14 дана после дехелминтизације (T₁-T₄), а X_c просечна вредност јпг контролне групе оваца 10-14 дана после дехелминтизације.

У RESO програму су израчунати 95 % интервали поверења. Опет, налази су тумачени у складу са поменутиим препорукама WAAVP. Четрнаестог дана, код пет оваца (по једна из група T₁-T₃ и две из групе T₄) није узорковани измет због празне *ampulla recti*, па су оне искључене из анализе резултата FECR теста.

Такође, израчуната је ефикасност ивермектина против појединих родова стронгилида. Претходно је од просечног броја јаја за сваку групу израчунат број јаја за одређени род, да би био задовољен услов да сваки род буде адекватно заступљен за FECR тест са најмање 50 јпг нултог дана (McKenna, 1996).

Број јаја за појединачни род је одређен по следећој формули:

$$X = Y (\%) * X_t / 100$$

где је Y проценат инфективних ларвица посматраног рода након копрокултуре 0-ог дана, а X_t је просечан број јаја за посматрану групу 0-ог дана. Поређење ефикасности ивермектина против појединих родова је урађено у RESO програму убацивањем вредности броја јаја 14-ог дана за испитивани род стронгилида.

Помоћу хи-квадрат теста на нивоу значајности 95% (p≤0,05) је испитано да ли постоји статистички значајна разлика у ефикасности ивермектина између огледних група. У случају да је за нека посматрања очекивана вредност за хи-квадрат тест била мања од 5, уместо њега је онда коришћен Фишеров тест поузданости (Petrie и Watson, 2006). Хи-квадрат тестом су упоређени резултати копрокултуре 0-ог дана за све групе (укључујући и контролну) да се провери варијабилност у генеричком саставу стронгилида између различитих група оваца које потичу из истог запата. У случај постојања статистички значајне разлике у ефикасности лека, односно у генеричком саставу стронгилида пре почетка теста, вредности добијене за сваку испитивану групу су тад појединачно упоређене помоћу хи-квадрат теста да се утврди које се од њих разликују. Калкулација је урађена у програму Quantitative Parasitology 3.0 (Rosza и сар, 2000). Резултати FECR теста су интерпретирани по препоруци WAAVP како је описано раније.

4.3.3.2. Октобар 2015

Добро је познато да, у нашим теренским условима, међу ветеринарима и овчарима углавном важи правило да ако се посумња на паразитски гастроентеритис на основу појаве симптома код дела оваца, најчешће се ради третман целог запата. При томе се не води рачуна

о томе како ће таква пракса утицати на појаву и одржавање резистенције на антихелминтике. Имајући у виду резистенцију на антихелминтике, постављено је питање, да ли је потребно третирати сваку јединку или није. Поред провере о потреби за дехелмитизацијом, прилика је искоришћена за поновљено тестирање ефикасности ивермектина, јер су сви FECR тестови урађени у пролеће или лето (2012. године) а ниједан јесењем периоду када је генерички састав стронгилида у овцама другачији.

У периоду од два узастопна дана је из запата насумично ухваћено 30 оваца које нису имале пролив, ради узимања узорак измета (директно из ректума) за паразитолошки преглед. Првог дана је ухваћено 16 оваца; оне су искоришћене истовремено за FECR тест и проверу потребе за дехелмитизацијом. Те овце су измерене на сточној ваги и одмах третиране ивермектином (Promectine®, Invesa Industrial Veterinaria S.A., Шпанија) у препорученој дози (0,2 мг/кг ТМ), без претходног паразитолошког прегледа. Код једне овце није било измета, па је скупљено 15 узорак од 16 третираних оваца. Другог дана је узето још 14 узорак, тако да је за проверу потребе за дехелмитизацијом укупно прегледано 29 узорак оваца.

У свим узорцима, јаја стронгилида су избројана методом по McMaster-у (осетљивост=25 јпг, раствор за флотацију NaCl, spg: 1,200), при чему су јаја стронгилида и *Nematodirus* spp. бројана посебно. Копрокултура је урађена само за овце у FECR тесту. Збирни узорци измета су култивисани (на 27°C током 7 дана) и ларве стронгилида у свакој групи су идентификоване до нивоа рода.

За одређивање потребе за дехелмитизацијом је установљена гранична вредност („cut off“) од 500 јпг (Taylor, 2010; Santurio и сар, 2011). Све овце које су након прегледа имале мање од наведене вредности не треба (није требало-у случају „наслепо“ третираних оваца) дехелминтисати, и супротно. Такође, процењен је интензитет инвазије прегледаних 29 оваца на основу задатих критеријума из Табеле 5 ради пребројавања оваца које имају висок ниво инвазије и којима је третман најнеопходнији.

Од 15 прегледаних узорак третираних оваца, израчунавање ефикасности ивермектина је обухватило све животиње код којих је број јаја по граму измета најмање био 150 јпг.

Редукција јаја је израчуната формулом:

$$R (\%) = 100(1-T_2/T_1),$$

где је T_1 и T_2 просечан број јаја у T групи пре и после лечења (McKenna, 2006). Методом по Wurston-у и Martin-у применом RESO програма су израчунати 95% интервали поверења (McKenna, 2013). Резултати FECR теста су интерпретирани по препоруци WAAVP како је описано раније.

4.4. Испитивање особина нематофагне гљиве *duddingtonia flagrans*

2.4.1. Изолат *Duddingtonia flagrans* коришћен у огледима

Нематофагна гљива *D. flagrans* која је коришћена у огледима приликом израде ове докторске дисертације је купљена 2008. године, уз дозволу за коришћење у научно-истраживачке сврхе, из миколошке колекције Католичког универзитета у Лувену, Белгија

(Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, скраћено MUCL), назив изолата MUCL 9827, пуно име врсте *Duddingtonia flagrans* (Duddington) R. C. Cooke 1969.

2.4.2. Испитивање морфолошких карактеристика изолата *D. flagrans* MUCL 9278

Морфологија **хламидоспора** изолата *D. flagrans* MUCL 9278 је испитивана на светлосном микроскопу. Хламидоспоре су добијене стругањем стерилном езом или скапелом са површине PDA културе у коју је додато неколико милилитара стерилног физиолошког раствора или дестиловане воде. Затим је суспензија процеђена кроз кухињско сито, и направљена серија препарата помоћу микропипете, где је додата по једна кап суспензије хламидоспора на предметно стакло. Препарати су затим прекривени покровном луспицом и анализирани под микроскопом. Направљене су фотографије хламидоспора на тринокуларном микроскопу (BIM-321T, Budapesti Távcso Centrum, Budapest, Мађарска) на увећању 400x, које су омогућиле морфолошку и морфометријску анализу. Мерење појединачних хламидоспора је урађено у бесплатном програму UTHSCSA Image Tool 3.0 (<http://compdent.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>).

Појединачне **хифе** које су састругане заједно са хламидоспорама су такође посматране (и усликане) под светлосним микроскопом. **Мицелијум**, којег формира мноштво испреплетених хифа, је посматран под светлосним и стереомикроскопом. Начињене су и фотографије и описан је макроскопски изглед мицелијума након раста на PDA агару.

Замке за хватање ларвица, односно **нематофгна активност**, су посматране на 2 % гладном агару после додавања суспензије ларвица мешаних врста желудачно-цревних стронгилида оваца у седмодневну културу *D. flagrans* MUCL 9278. Културе су прегледане неколико дана након додавања ларвица да би се на мицелијуму уочило појављивање и развој замки. Током израде дисертације није планирано добијање **конидија** *D. flagrans* и испитивање њихове морфологије. Начињена је и серија фотографија замки кроз окулар светлосног микроскопа помоћу мобилног телефона Samsung S 3Neo (камером са 8MP (мега пиксела)) на увећањима од 40x и 100x и на тринокуларном микроскопу (BIM-321T, Budapesti Távcso Centrum, Budapest, Мађарска) на увећањима 40x, 100x и 250x.

2.4.3. Умножавање културе гљиве на хранљивим подлогама

2.4.3.1. Раст на кромпировом агару

За умножавање гљиве MUCL 9827 у лабораторијским условима је коришћен кромпир-декстроза агар (енглески potato dextrose agar, скраћено PDA) као што је и препоручено од стране добављача. У зависности од тога да ли је у моменту приправљања подлоге било комерцијалног PDA или није, коришћене су две рецептуре и обе ће бити описане. У почетку је коришћен PDA који након припреме има благо киселу рН вредност (рН=6). Како је у литератури описано да *D. flagrans* подноси базни рН, чиме се смањује могућност контаминације културе другим гљивама (Gardner и сар, 2000), касније је припреман PDA са рН=9.

Припрема некомерцијалне PDA подлоге за култивацију *Duddingtonia flagrans*

У недостатку комерцијалног PDA, ова подлога је успешно прављена у лабораторији по узору на рецептуру из приручника (Handbook of Microbiological Culture Media, 1999). Сви остали састојци неопходни за PDA су били доступни, осим кромпировог екстракта, који је добијен посебном процедуром. Количина овог екстракта и осталих додатих састојака је слична задатој рецептури, али је ипак некомерцијални PDA направљен уз мање модификације на следећи начин:

1. Одмерити 200 грама ољуштеног и исецканог кропмира на аналитичкој ваги, додати га у металну посуду од 2 литра и кувати најмање 30 минута у литру дестиловане воде
2. Скувани кропмир филтрирати кроз вату да се добије кромпиров екстракт, допунити посуду дестилованом водом до 1 литре и прохладити.
3. Одмерити 16 грама агара и 40 грама декстрозе и додати у литар кропмировог екстракта
4. Подлогу кувати на умереној ватри уз стално мешање до потпуног растварања агара
5. Подлогу охладити до 60°C и онда је пресути у ерленмајере до запремине 250 мл.
6. По потреби, додатком 10% КОН подесити жељену рН вредност на 6 или 9 и то проверити помоћу рН метра
7. Затим подлогу аутоклавирати на 121°C при притиску од 1,5 КПа током 20 минута
8. Након аутоклавирања и хлађења, подлогу разлити у Петри кутије за потребе огледа, или је чувати на тамном и сувом месту до употребе.

Припрема комерцијалне PDA подлоге за култивацију *Duddingtonia flagrans*

1. Одмерити 42 грама сувог PDA агара на аналитичкој ваги и додати у металну посуду запремине 2 литра (произвођач Biolife, Италија)
2. Додати 1000 милилитара хладне дестиловане воде
3. Подлогу кувати на умереној ватри уз стално мешање до потпуног растварања агара
4. Подлогу охладити до 60°C и онда је пресути у ерленмајере до запремине 250 мл.
5. По потреби, додатком 10% КОН подесити жељену рН вредност на 6 или 9 и то проверити помоћу рН метра
6. Затим подлогу аутоклавирати на 121°C при притиску од 1,5 КПа током 20 минута
7. Након аутоклавирања и хлађења, подлогу разлити у Петри кутије за потребе огледа, или је чувати на тамном и сувом месту до употребе.

Како је установљено да је динамика раста и сазревања изолата *D. flagrans* MUCL 9278 на различитим PDA подлогама веома слична, детаљан опис овог процеса је урађен на некомерцијалној подлози рН=6. У 6 Петри кутија је на центар подлоге разливено по 1 мл

непроцеђене суспензије гљиве (физиолошки раствор са хламидоспорама и фрагментима мицелијума узет одмах након стругања старе културе) и раширен по површини помоћу стерилног стакленог штапића. Подлоге су затим пребачене у термостат на 25°C и раст на кромпировом агару је праћен током 16 дана, где су прегледане све кутије макроскопски и микроскопски помоћу инвертног микроскопа а једна Петри кутија је отворана у одређеним временским интервалима да би послужила за сликање културе (макроскопске и микроскопске слике (стереомикроскоп, увећање 40x) фотографисане мобилним телефоном Samsung S 3Neo).

2.4.3.2. Раст на гладном агару

Двопроцентни „водени“ или „гладни“ агар (енглески 2% water agar, скраћено 2% WA) је медијум који се користи за испитивање нематофагне активности нематофагних гљива на ларвице нематода, јер се лако уочавају различите морфолошке структуре гљива и нематофагна активност. Тако је за део истраживања направљен гладни агар са додатком антибиотика (у овом случају је додат хлорамфеникол) како би се спречио раст бактерија и контаминација културе гљиве.

Поступак припреме 2 % гладног агара са додатком хлорамфеникола (CHF-WA 2%) (Shams Ghahfarokhi и сар, 2004)

1. Одмерити 20 грама агара на аналитичкој ваги и додати у металну посуду запремине 2 литра
2. Додати 1000 милилитара дестиловане воде
3. Подлогу кувати на умереној ватри уз стално мешање до потпуног растварања агара
4. Подлогу охладити до 60°C и онда је пресути у ерленмајере до запремине 250 мл.
5. Затим подлогу аутоклавирати на 121°C при притиску од 1,5 КПа током 20 минута
6. Током аутоклавирања подлоге, отсећи комад алуминијумске фолије и пребрисати га 70% етанолом ради дезинфекције.
7. Измерити 0,125 грама хлорамфеникола (Sigma Chemicals, USA) и преклопити фолију.
8. Хлорамфеникол додати у аутоклавирану подлогу која је охлађена на 60°C и мешати док се не раствори у потпуности.
9. Након мешања, подлогу разлити у Петри кутије за потребе огледа, или је чувати на тамном и сувом месту до употребе.

За испитивање раста изолата *D. flagrans* MUCL 9278 на CHF-WA 2%, подлоге су засејаване на два начина:

а) додавањем 500 хламидоспора:

- у три Петри кутије је додата наведена количина спора садржана у око 30 µl концентроване радне суспензије гљиве. Одмах затим, на већ додату суспензију гљиве, додато је још 70 µl стерилног физиолошког раствора да би се укупна количина хламидоспора могла равномерно

раширити по подлози помоћу стерилног стакленог штапића. Подлоге су затим пребачене у термостат на 25°C и посматране током 10 дана.

б) убацивањем дискова агара са седмодневном културом гљиве.

- у три Петри кутије је засејана гљива применом „agar block“ технике (Nansen и сар, 1986; Shams Ghahfarokhi и сар, 2004). Пре пресејавања, *D. flagrans* је култивисана на PDA седам дана, и онда је на култури направљено неколико исечака помоћу металног инструмента (комад шупље цеви пречника око 6 mm) и по један комадић агара је пребачен на гладни агар у центар Петри кутије. Подлоге су затим пребачене у термостат на 25°C и посматране током 10 дана.

4.5. Испитивање *in vitro* ефекта изолата *D. flagrans* mucl 9278 на желудачно-цревне стронгилиде оваца

4.5.1. Припрема суспензије гљиве и инфективних ларвица

4.5.1.1. Припрема радне суспензије гљиве

Ради припремања радне суспензије хламидоспора, *D. flagrans* MUCL 9278 је засејана на PDA агар и култивисана најмање четири недеље на 25°C у стандардним пластичним Петри кутијама да би се обезбедила продукција и сазревање довољног број хламидоспора.

За припрему радне суспензије, хламидоспоре *D. flagrans* су прикупљане тако што је пет милилитара стерилног физиолошког раствора додато на површину културе гљиве на PDA подлози у сваку Петријеву кутију. Културе су затим састругане стерилном езом или скалпелом и прикупљене у стаклени ерленмајер запремине 250 мл. Хламидоспоре су раздвојене од мицелијума мешањем, прањем и просејавањем суспензије уз помоћ технике према Ojeda-Robertos и сарадника (2005), уз мање модификације, да се добије радна суспензија где је максималан број спора одвојен од мицелијума. Суспензија гљиве је енергично протресена и затим мешана на магнетној мешалици током 6 сати. После мешања, суспензија процеђена прво кроз сито промера 1 mm (цедиљка за чај) и гњечена кашиком како би се максимална количина хламидоспора одвојила од мицелијума. Ипак, већина хламидоспора је остала у ситу, па је процес поновљен три пута да би се постигла максимална сепарација хламидоспора. Следи филтрација суспензије кроз фино сито промера 100 µm, што резултира много мањом количином мицелијума и хламидоспора у ланцу у коначној суспензији. После примене ове технике, постигнут је задовољавајући ниво одвајања, што је и потврђено микроскопским прегледом суспензије где је забележен спорадични налаз до неколико хламидоспора везаних за мицелијум у низу. Радна суспензија је пребачена у пластичне фалконе од 50 ml. Неки од фалкона су центрифугирани на 1500 обртаја током 5 минута, а раствор изнад талоба аспириран ради смањења укупне запремине и концентрације хламидоспора. Затим је урађена квантификација хламидоспора у радној суспензији тако што је суспензија добро

хомогенизована мешањем на „вортексу“, и у десет подузорака запремине 5 μ l су избројане све споре. Пре сваког понављања суспензија је интензивно мешана. Радна суспензија хламидоспора познате концетрације у различитим фалконима је складиштена је у фрижидеру на 4°C до употребе.

4.5.1.2. Припрема радне суспензије инфективних ларвица

За добијање инфективних ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца свежје узорковани измет је култивисан на 27°C током 7 дана (процедура је описана). После овог периода, ларвице су добијене модификованом методом по Baermann-у или методом по Roberts-у и O'Sullivan-у.

Након добијања, инфективне ларвице је потребно прочистити од честица фекалног порекла (биљна влакна и друге несварене материје, агломерати бактерија и сл.). Ово је урађено помоћу посебне технике прочишћавања ларвица раствором сахарозе (MAFF, 1986), уз мање модификације:

Модификована MAFF техника прочишћавања инфективних ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца раствором сахарозе

1. Помешати 20 грама сахарозе и 50 ml дестиловане воде у мањи ерленмајер. Растворити током загревања на магнетној мешалици.
2. Суспензију ларвица (1,5 ml) пребацити у стаклену конусну епрувету запремине 12 ml.
3. Помоћу пластичне дводелне брызгалице запремине 2 ml на којој се налази игла, додати 1 ml раствора сахарозе на дно епрувете (испод суспензије ларвица) тако да се слојеви не мешају.
4. Центрифугирати 3-5 минута на 2000 обртаја.
5. Помоћу аутоматске пипете са наставцима од 5 ml, аспирирати ларвице које се налазе на прелазу слојева раствора сахарозе и воде у којој су оне биле суспендоване и додати их у нову епрувету.
6. Испрати ларвице додавањем воде са чесме до нивоа 10 ml и центрифугирати на 1500 обртаја током 3 минута. Поступак поновити три пута да би се отклонили остаци раствора сахарозе.
7. Након завршеног испирања, додати воду до претходног нивоа, затворити епрувету и чувати ларвице на 4°C до употребе.

Даља припрема ларвица је зависила од тога да ли су у огледима интеракције гљиве и ларвица коришћене подлоге са додатком хлорамфеникола или нису. Уколико јесу, претходно описана процедура прочишћавања ларвица је коришћена. Уколико нису, био је потребан додатни корак испирања ларвица у раствору антибиотика, како би се убиле бактерије и онемогућила контаминација подлога која би отежавала визуелизацију *in vitro* нематофагне активности *D. flagrans* MUCL 9827.

Испирање инфективних ларвица желудачно-цревних стронгилида
оваца у раствору антибиотика

(Gonzalez Cruz и сар, 1998; Campos и сар, 2009)

1. Направити раствор антибиотика (пеницилин 200 интернационалних јединица/ стрептомицин 260 mg/ ml)
2. Држати ларвице сат времена;
3. Поновити поступак испирања стерилном водом са чесме или стерилним физиолошким раствором.

4.5.2. *In vitro* провера нематофагне активности изолата *Duddingtonia flagrans* MUCL 9827 на ларвице желудачно-цревних стронгилида оваца

За испитивање интеракције између *D. flagrans* (и нематофагних гљива уопште) и инфективних ларвица нематода које паразитирају код домаћих и дивљих животиња, у литератури је описано неколико различитих протокола где се ларвице и гљива мешају у различито време (конидије/хламидоспоре се мешају одмах са ларвицама (Braga и сар, 2013), ларвице се додају четири дана после хламидоспора (Gonzales Garduno и сар, 2005)) или се ларвице додају у Петри кутију засејану комадићем културе гљиве старе четири до седам дана (Gonzalez Cruz и сар, 1998; Nansen и сар, 1986; Campos и сар, 2009). Испитивање карактеристика изолата *D. flagrans* MUCL 9278 за потребе ове дисертације обухватило је све три процедуре, које су описане у овом поглављу.

4.5.2.1. Хламидоспоре и ларвице помешане одмах

У три Петри кутије пречника 5,5 cm је разливен 2 % гладни агар са додатком хлорамфеникола (CHF-WA 2%). Након хлађења, на површину подлоге је додато 30 μ l концентроване радне суспензије гљиве са око 500 хламидоспора. Одмах затим, на већ додату суспензију гљиве, додато је још 70 μ l стерилног физиолошког раствора да би се укупна количина хламидоспора могла равномерно раширити по подлози помоћу стерилног стакленог штапића. Након сушења површине подлоге, у Петри кутије је додато 130 μ l суспензије која је садржала око 500 ларвица мешаних врста желудачно-цревних стронгилида оваца. Подлоге су затим пребачене у термостат на 25°C током 7 дана. Нематофагна активност гљиве је праћена и бележена након 24 и 48 сати проналажењем живих, ухваћених или мртвих ларви у најмање 6-10 видних поља једне кутије помоћу стереомикроскопа (увеличање 40x).

Контрола је постављена у три Петри кутије са истом подлогом (CHF-WA 2%), у коју је додато суспензија са око 500 ларвица мешаних врста желудачно-цревних стронгилида оваца (како је већ описано), без додате *D. flagrans*. Инкубација и процена броја ларвица је урађена на исти начин као и код претходног сета узорак. Ова контрола је послужила и за процену ефикасности гљиве у сету узорак где су ларвице додате седам дана након засејавања хламидоспора и у сету узорак где је посматран ефекат пресејане културе гљиве која је расла на кромпир-декстроза агару седам дана.

За процену укупне редукције ларви након седам дана интеракције са гљивом, планирано је скидање културе металном шпатулом из Петри кутије, завијање у газу, и постављање у пластичну чашу ради седиментације ларвица (Берманов метод). Ефикасност се рачуна поређењем са бројем ларвица у добијеним екстракцијом контролних узорака.

4.5.2.2. Ларвице додате 7 дана након хламидоспора

На основу динамике раста изолата гљиве на гладном агару која је забележена током испитивања, донета је одлука да се култура остави седам дана у термостату како би се мицелијум боље развио, уместо да стоји четири дана како су описали Gonzales Garduno и сарадници (2005). Поред овога, одлучено је да ће бити засејане две различите концентрације хламидоспора. Тако је у укупно шест Петри кутија пречника 5,5 cm са CHF-WA 2% инокулисано око 500 (3 кутије) односно 1000 хламидоспора (3 кутије), на начин који је већ описан. Седам дана након раста гљиве на подлози, додато је такође 130 μ l суспензије са око 500 ларвица мешаних врста желудачно-цревних стронгилида. Петри кутије су стављене у термостат и нематофагна активност гљиве је праћена на начин како је описано у претходном одељку.

4.5.2.3. Ларвице додате у културу мицелијума стару 7 дана

У Петри кутију пречника 5,5 cm је разливено око 10 ml кромпир-декстроза агара (PDA, pH=6). Након хлађења подлоге, засејана је *D. flagrans* на начин који је већ описан. Култура је пребачена у термостат да расте на 25°C током 7 дана. Након овог периода, у три Петри кутије у које је разливен 2 % гладни агар (CHF-WA 2%) је засејан комадић PDA агара са седмодневном културом *D. flagrans* такозваном „agar block“ техником (Nansen и сар, 1986; Shams Ghahfarokhi и сар, 2004). Помоћу металног инструмента (комад шупље цеви пречника око 6 mm) је направљено неколико исечака на седмодневој култури гљиве. Стерилном металном иглом је сваки комадић пребачен у центар Петри кутије са CHF-WA 2%. Затим је у сваку кутију додато око 500 ларвица мешаних врста желудачно-цревних стронгилида (како је већ описано). Узорци су инкубирани и прегледани као и претходна два сета узорака.

У све Петри кутије (осим у оне где су ларвице и хламидоспоре помешане истовремено) је петог дана од првог додавања ларвица, додато још по 500 ларвица ради стимулације нематофагне активности.

4.5.3. Тест копрокултуре - ефекат *D. flagrans* посматран кроз однос ХПГ:ЈПГ

4.5.3.1. Избор експерименталних животиња

За овај део огледа потребно је дванаест оваца (старости преко годину дана, просечне телесне тежине око 50 kg) при чему је свака животиња посебна експериментална јединица. Осам оваца није третирано никаквим антипаразитиком, и претпоставља се да су заражене пријемчивим (у највећем проценту) желудачно-цревним стронгилидама. Друге четири овце су изабране из групе од 16 оваца третираних поткожном ињекцијом ивермектина у октобру 2015.

Изабране су јединке које су излучивале највише јаја 14 дана после третмана ивермектином, и сматра се да је у том делу огледа испитивана интеракција гљиве и теренског изолата желудачно-цревних стронгилида резистентног на ивермектин. На овај начин је испитана могућност употребе изолата гљиве MUCL 9287 за контролу резистентних стронгилида, што је и главни циљ примене *D. flagrans*. Животиње су изабране током неколико одлазака на имање. Од више оваца је током прве посете узет узорак измета директно из ректума, и урађена квантификација паразитских елемената методом по McMaster-у аналитичке осетљивости 25 јлг. На основу резултата копролошког прегледа, бирани су животиње са различитим нивоом инвазије из обе групе оваца (третиране и нетретиране).

4.5.3.2. Утврђивање одсуства нематофагних гљива у огледним животињама

Одсуство нематофагних гљива у измету донора је утврђено пре почетка огледа према методи Ojeda-Robertos и сарадника (2005) уз мање модификације. По један брабоњак од сваке овце је постављен у Петри кутију са 2% воденим агаром уз додатак хлорамфеникола. Кутије су затворене и инкубирани на собној температури 7 дана. Другог дана инкубације је додато око 1000 инфективних ларвица (мешана култура, од више врста) ради стимулације развоја структура за хватање нематода. После периода инкубације, површина сваке кутије је прегледана под стереомикроскопом на увећању 40 пута ради идентификације типичних структура нематофагних гљива, укључујући и *D. flagrans*, током 2 дана. У случају позитивног налаза присуства других гљива, није се приступило идентификацији пронађених родова односно врста.

4.5.3.3. Избор односа ХПГ:ЈПГ и постављање огледа

Пре описа избора односа ХПГ:ЈПГ и теста копрокултуре је описан поступак стерилизације говеђег измета, јер је послужио у извођењу теста копрокултуре. Уситњени говеђи измет додат у сваку појединачну копрокултуру је послужио за упијање вишка течности која је последица додавања суспензије гљиве и стерилне дестиловане воде. За прављење стерилног говеђег измета, током лета 2012. године је прво сакупљен осушен говеђи измет са пашњака, донет у лабораторију и изломљен или исечен ножем на ситне комадиће. Да би могао бити употребљен у тесту копрокултуре, говеђи измет је морао бити стерилисан како би се уништили евентуално присутни различити развојни облици говеђих паразита, слободноживећих организама који колонизују измет и споре нематофагних гљива које би могле да утичу на резултат теста.

Поступак стерилизације говеђег измета:

1. Суви комадићи говеђег измета су фино уситњени помоћу стакленог тучка у већем стакленом авану;
2. Измрвљени измет је затим пребачен у литарске стаклене тегле са металним затварачем;

3. Говеђи измет је потом аутоклавиран на 121°C при притиску од 1,5 КПа током 20 минута.
4. Након хлађења, уситњен и стерилисан измет је чуван у стакленим теглама до употребе.

Избор односа ХПГ:ЈПГ који ће бити испитивани у огледу је заснован на резултатима Ојед-Робертос и сарадника (2008а) и екстраполацијом података из рада Санјал и сарадника (2008). Изабрано је четири различите дозе хламидоспора које ће бити додате на једно јаје стронгилида, тако да су у тесту копрокултуре испитивани односи ХПГ:ЈПГ по једној експерименталној јединици (овци) били следећи:

1. Нула хламидоспора на једно јаје стронгилида тј. **однос 0:1 (контрола)**;
2. Две хламидоспоре на једно јаје стронгилида тј. **однос 2:1**;
3. Пет хламидоспора на једно јаје стронгилида тј. **однос 5:1**;
4. Десет хламидоспора на једно јаје стронгилида тј. **однос 10:1**;
5. Двадесет хламидоспора на једно јаје стронгилида тј. **однос 20:1**.

За сваку дозу (однос) урађено је по 3 понављања, што укупно чини 15 копрокултура по једној експерименталној јединици, односно 180 копрокултура у целом огледу.

In vitro тест копрокултуре је постављен на следећи начин:

1. Сакупљен је измет од донора помоћу ама, однет у лабораторију и измерен на аналитичкој ваги;
2. Када је скупљена довољна количина, узорак је тада пребачен у пластичну посуду одговарајуће запремине и темељно хомогенизован помоћу обичног кухињског миксера;
3. Измерено је 5 грама (у дупликату) и урађено је бројање јаја стронгилида помоћу MINI FLOTAC технике, аналитичке осетљивости 5 јпг. Израчунат је просечан број јаја стронгилида за посматрану овцу;
4. Прорачуната је доза хламидоспора за сваку копрокултуру узимајући у обзир налаз ЈПГ и задате односе ХПГ:ЈПГ;
5. Затим је у пластичне бочице за урин мерено по десет грама измета (4 дозе и контрола, 3 понављања за сваку копрокултуру=15 копрокултура по експерименталној јединици);
6. У сваку копрокултуру је додата одговарајућа запремина суспензије хламидоспора *D. flagrans* и узорак је мануелно добро хомогенизован. Због различите потребне дозе хламидоспора, количина додате радне суспензије се разликовала за поједине односе ХПГ:ЈПГ. Зато је укупна запремина суспензије за све појединачне културе изједначена додавањем стерилне дестиловане воде тамо где је неопходно.
7. У сваку копрокултуру је по потреби додато 5-10 грама стерилисаног говеђег измета како би се обезбедила оптимална влажност.
8. Пластичне бочице за урин су тада прекривене комадом стерилне газе која је фиксирана око бочице гумицом.

9. У пластичну чашу запремине 200 мл је додато 10 мл дестиловане воде, и направљена култура је стављена обрнуто у њу.
10. Културе су пребачене у термостат на 25°C током 10 дана;
11. После 10 дана је у сваку појединачну културу сипана топла вода са чесме тако да измет буде потпуно потопљен, и културе су остављене на собној температури 24 часа ради таложења ларвица.
12. Након седиментације ларвица, бочица за урин са културом је извађена из пластичне чаше, које су затим премештене у фрижидер на 4°C да се ларвице поново исталоже током неколико сати.
13. После таложења ларвица у фрижидеру, супернатант је аспириран помоћу пластичне бризгалице, а талог са ларвицама је присут у пластичне фалконе са затварачем запремине 50 ml који су чувани у фрижидеру до прегледа.

4.5.3.4. Израчунавање процента развоја и процента редукције ларви

После издвајања, било неопходно и бројање ларвица ради израчунавања процента њиховог развоја (односно мерење „приноса“ (енг. larval yield)). Из фалкона са суспензијом ларвица је аспириран раствор изнад талог тако да у фалкону остане око 5 мл суспензије. Затим је суспензија пресута у стаклене епрувете запремине 10 мл, центрифугирана на 1500 обртаја у минуту, и поново аспирирана тако да у епрувети остане 1 мл суспензије са ларвицама у талогу. Да би се утврдио број ларвица које су се развиле у појединачној копрокултури, узорак је претходно темељно хомогенизован („вортекс“) како би се постигла подједнака дистрибуција ларвица у целокупној запремини узорка. Затим су ларвице бројане у десет подузорака од 10 μ l (слично као у Ojeda-Robertos и сар, 2008а), а подаци изражени као укупан број ларви по граму измета (ЛПГ) на основу следеће формуле:

$$\text{ЛПГ} = nL_3 \times (100 / Ti).$$

где је nL_3 просечан број ларви у десет подузорака узетих из почетне суспензије ларвица а Ti тежина измета употребљена за копрокултуру изражена у грамима.

Принос ларви је израчунат по следећој формули (Peraud и сар, 2005) и изражен у процентима:

$$LY (\%) = (\text{ЛПГ} / \text{ЈПГ}) * 100$$

где је LY принос ларви за појединачну копрокултуру, ЛПГ укупан број ларви по граму измета и ЈПГ број јаја по граму измета израчунат за сваку експерименталну јединицу.

Проценат редукције ларви у тесту копрокултуре израчунат је по формули Terrill-а и сарадника (2004):

$$PR (\%) = 100 - (X_{tLY} * 100 / X_{cLY})$$

где је PR проценат редукције ларви, X_{tLY} просечан принос ларви у огледној групи за посматрану експерименталну јединицу а X_{cLY} просечан принос ларви у контролној групи за посматрану експерименталну јединицу.

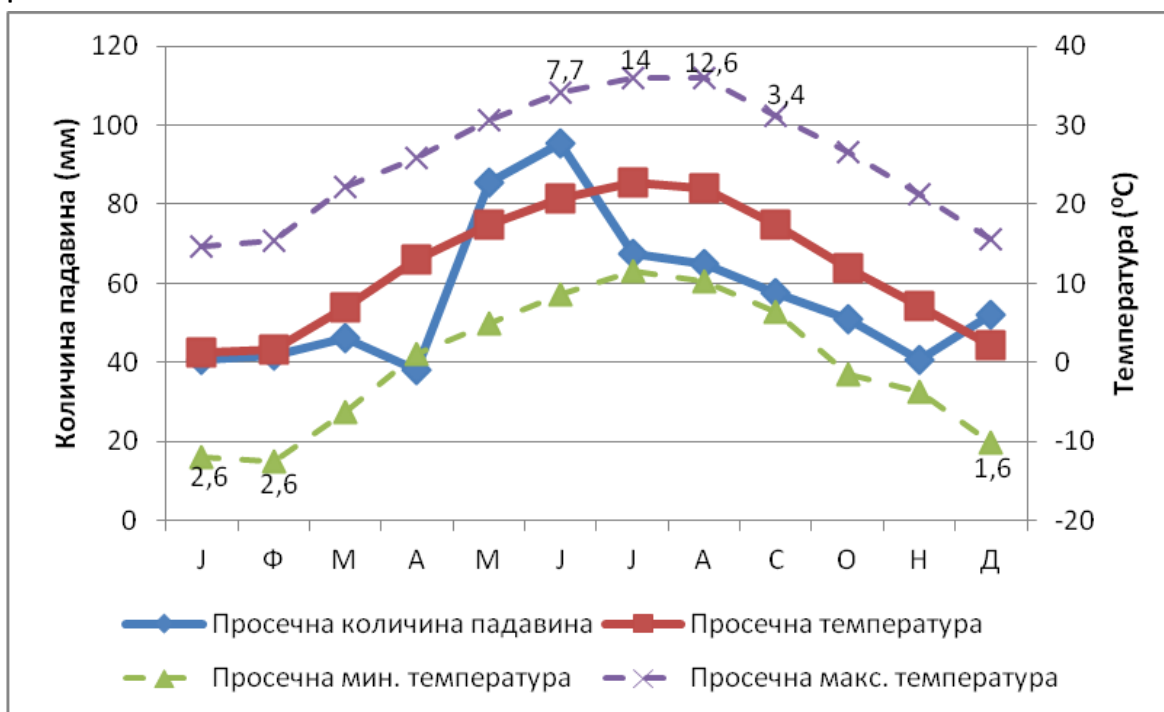
Пре анализе резултата теста копрокултуре, испитано је присуство варијације између процента приноса ларвица у оквиру три понављања на нивоу сваког појединачног узорка уз помоћ хи-квадрат теста, да би се пронашли узорци који не могу учествовати у анализи утицаја доза гљиве на редукцију ларвица. Калкулација је урађена у програму Quantitative Parasitology 3.0 (Rosza и сар, 2000). За процену значаја редукције ларвица различитих доза гљиве у односу на контролу, поређени су просечни приноси ларвица помоћу АНОВА теста. Испитивање ефекта различитих ХПГ:ЈПГ односа *D. fragrans* на приносе ларвица је урађено Фишеровим тестом најмање значајне разлике. Калкулације су урађене у програму Statgraphics Centurion XVI.I. У циљу утврђивања оптималног односа ХПГ:ЈПГ за редукцију ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца је упоређен проценат редукције употребљених доза гљиве помоћу хи-квадрат теста у програму Quantitative Parasitology 3.0 (Rosza и сар, 2000).

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Климатски параметри и историја дехелминтизације

Забележено је да је у периоду од 2005-2014. према подацима метеоролошке станице Римски Шанчеви просечна годишња температура ваздуха износила 12,1°C а просечна годишња количина падавина 680 мм. Просечан број дана са температуром \leq од -10°C је 7,4, а просечан број тзв. тропских дана (температура \geq 30°C) износи 39,5. Расподела падавина по месецима и просечне месечне температуре (са екстремима), као и просечан број веома хладних и тропских дана за релевантне месеце, су приказани на Графикону 1.

Графикон 1. Приказ климатских параметара за станицу Римски Шанчеви за период 2005-2014. године.



За дехелминтизацију оваца су најчешће коришћени макроциклични лактони (ивермектин и повремено дорамектин), а поред ових лекова коришћен је и левамизол и клозантел. Бензимидазоли (албендазол) су коришћени само код јагњади. Овце су третиране у просеку $1,91 \pm 0,53$ (просек \pm стандардна девијација) пут годишње, са распоном од 1-3 третмана. Од почетка примене антипаразитета (од 1993.) до јула 2012. године се примењивао третман свих оваца у запату истовремено, без изузетака. Та пракса се мења од јула 2012. године (када је спроведена прва провера ефикасности ивермектина) у смислу да ако је свака овца у запату добила антипаразитик без обзира на реалну потребу, третман није урађен истовремено, него су животиње дељене у две или више група третираних у различито време. Селективни третман се примењује повремено од 2013. године у виду примене FAMACHA дијаграма. Детаљни резултати анализираних података о дехелминтизацији су приказани у Табели 6.

Табела 6. Историја дехелминтизације оваца на газдинству.

Датум	Антихелминтик	Напомене
1993-2004.	Ивермектин	Историја дехелминтизације није прецизно вођена. По речима власника, све овце су углавном третиране два пута годишње, у пролеће и у јесен.
Јул 2005.	Ивермектин	Третиран цео запат.
Март 2007.	Ивермектин	Третиран цео запат.
Мај 2007.	Ивермектин	Третиран цео запат.
Јул 2008.	Дорамектин	Третиран цео запат.
Август 2009.	Ивермектин	Третиран цео запат.
Април 2010.	Дорамектин	Третиран цео запат.
Мај 2010.	Ивермектин, дорамектин	Третиран цео запат. Део оваца третирано једним а део другим леком.
Новембар 2010.	Ивермектин	Третиран цео запат.
Јун 2011.	Ивермектин	Третиран цео запат. Слабо напредовање оваца након третмана. Није детаљно истражено.
Јул 2011.	Дорамектин	Третиран цео запат.
Март 2012.	Дорамектин	Третиран цео запат.
Јул 2012.	Ивермектин	Третирано 15 оваца. Прва провера ефикасности лека.
Август 2012.	Ивермектин	Третиран остатак оваца из запата.
Март 2013.	Ивермектин	Друга провера ефикасности лека. Укупно третирано 25 оваца у две групе (10+15 оваца).
Април 2013.	Ивермектин	Друга провера ефикасности лека. Укупно третирано 30 оваца у три групе од по 10 јединки.
Јул 2013.	Клозантел, левамизол	Третиран остатак оваца из запата. Третман заснован на резултатима обдукције једне овце. Све овце (106 јединки) прегледане FAMACHA дијаграмом-прва употреба дијаграма.
Новембар 2013.	Левамизол	Третиран цео запат.
Јун 2014.	Ивермектин	Третман заснован на FAMACHA оценама. Од 118 прегледаних животиња, 24 овце нису третиране.
Новембар 2014.	Ивермектин	Дванаест оваца није третирано од 110 у запату.
Мај 2015.	Ивермектин	Трећа провера ефикасности лека. У огледу третирано 39 оваца и остатак запата, осим 10 оваца. Такође су третирана сва јагњад која су 2015. напасана са овцама.
Јул 2015.	Ивермектин	Третирана су сва јагњад на паши на основу паразитолошког прегледа.

Октобар 2015.	Албендазол, ивермектин	Почетком месеца третирана сва јагњад албендазолом (индикација клиничка болест). Крајем месеца су третиране овце (16 комада)-четврта провера ефикасности ивермектина.
---------------	---------------------------	--

5.2. Налази паразитолошких испитивања оваца

5.2.1. Налази клиничког прегледа оваца

5.2.1.1. Клиничка манифестација паразитског гастроентеритиса оваца

Status praesens прегледаних јединки је указао на низ симптома који су део синдрома паразитског гастроентеритиса и указују на могућност његовог постојања. **Положај** јагњета са ногама подвученим под тело и испруженим вратом сугерише на абдоминални бол (**dolor abdominalis**) и отежано дисање (**dispnoea**) у случају тешког гастритиса изазваног патогеном стронгилидом **Haemonchus contortus**. **Слабија телесна кондиција** код одрасле овце упућује на сумњу да се ради о хроничном супклиничком паразитизму комплексне етиологије (слика 16).



Слика 16. Погрбљени положај јагњета оболелог од хемонхозе (лево) и овца слабије телесне кондиције (десно), ориг.

Подвилични едем (oedema submandibularis) (накупљање трансудата испод доње вилице услед хипопротеинемије) је уочен код неколико јединки и може бити изазван **хемонхозом** (слика 17).



Слика 17.
Подвилични
едем код овце и
јагњета, ориг.

Пролив (*diarrhoea*) није био доминантан симптом код оваца током пашне сезоне, али је повремено забележен код мањег броја оваца као могућа последица паразитског гастроентеритиса где као узрочник доминира нека од врста која изазива пролив код пријемчивих животиња као што су *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus spp.* и/или *Nematodirus spp.* (слика 18).



Слика 18. Појава пролива
у запату (горе-беле
стрелице). Упрљани
перинеум и скочни
зглобови (лево) и житки
измет на вуни (десно),
ориг.

Конзистенција измета прегледаних оваца је варирала од налаза потпуно чврстог и сувог до житког, течног измета. Конзистенција може да сугерише који род/врста стронгилида доминира код заражене животиње. Када је то хемонхоза, измет је тамније боје због присуства сварене крви у њему, а уколико животиња не једе или не пије данима због абдоминалног бола, може доћи до хипотоније или потпуне атоније дигестивног тракта што резултира појавом опстипације. С друге стране, ако доминирају врсте које изазивају пролив (углавном из родова *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, и *Nematodirus*) измет је жидак и непријатног мириса (слика 19).



Слика 19.
Конзистенција
измета
прегледаних
оваца. Чврст
(лево) и жидак
измет (десно),
ориг.



Неколико пута приликом ректалне експлорације оваца су пронађени **цели хелминти** (нематоде) или њихови **сегменти** (цестоде). За разлику од налаза сегмената пантљичаре из рода *Moniezia*, налаз целих хелмината током ректалне експлорације оваца није уобичајен. Спорадичан налаз стронгилида који паразитирају у дебелом цреву, попут родова *Oesophagostomum* и *Chabertia* може да сугерише постојање супклиничког односно клиничког паразитског гастроентеритиса, чија је етиологија на имању сложена јер у њој, поред желудачно-цревних стронгилида, учествују и пантљичаре из рода *Moniezia* (слика 20).



Слика 20. Налаз стронгилида дебелог црева (лево) и сегмената пантљичаре из рода *Moniezia* приликом ректалне експлорације оваца, ориг.

Присуство **анемије (*anaemia*)**, праћено на почетку израде дисертације прегледом коњуктива и усне слузокоже, је забележено код већег броја оваца. Налази бледих слузница указивали су на могућност да је, поред других узрока непаразитске етиологије, у запату у већем броју присутна најпатогенија врста желудачно-цревних стронгилида ***Haemonchus contortus*** и/или други паразитски узрочници попут протозоа из рода ***Babesia*** односно других хематофагних паразита као што су ***Bunostomum spp.*** или ***Fasciola hepatica***.

5.2.1.2. Резултати примене FAMACHA© дијаграма у процени анемије

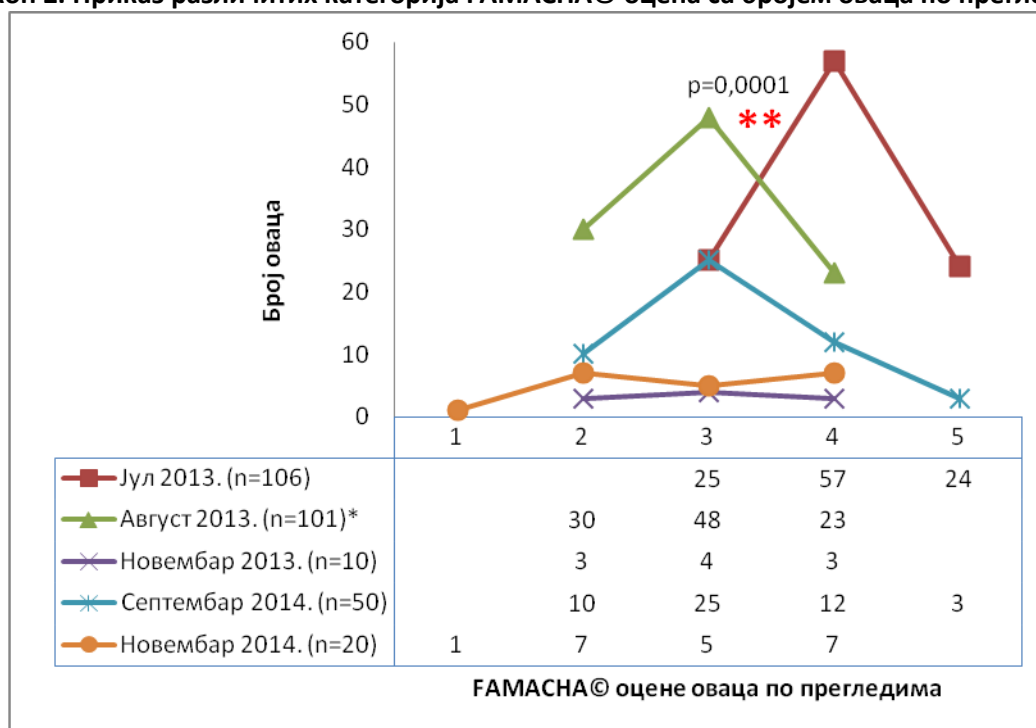
Прегледом оваца помоћу FAMACHA© дијаграма током две године, забележене су све оцене од најбоље (1) до најлошије (5) (слика 21). Приликом пет различитих посматрања, просечна оцена прегледаних јединки је најчешће била 3, а само у јулу 2013. године је била оцена 4. Клиничка анемија за критеријум FAMACHA© оцена 4 и 5 је забележена код око 45% оваца (кретала се у распону од 30% до преко 76%, зависно од датума прегледа). Ако се у дефинисање клиничке анемије укључи и оцена 3, онда је налаз анемичних оваца био већи и износи преко 82% (у распону од 60-100%) (Табела 7 и Графикон 2).

Табела 7. Укупни резултати прегледа клиничког оваца помоћу FAMACHA дијаграма.

ФАМАСНА оцена	Број оваца	(%)	Просечни хематокрит (%) ± с.г.	(мин-мах)	Просечан број јаја (jpr) ± с.г.	(мин-мах)
1	1	0,35	Н.у.	-	300	-
2	50	17,42	29 ± 0,5 (n=15)	24,96-32,16	611,76 ± 202,81 (n=17)	25-3025
3	107	37,28	28,02 ± 0,46 (n=28)	23,83-32,55	894,17 ± 229,88 (n=30)	0-5875
4	102	35,54	28,03 ± 0,67 (n=17)	22,32-32,05	909,21 ± 299,01 (n=19)	50-5425
5	27	9,41	22,76 ± 2,61 (n=3)	17,8-26,64	1441,67 ± 692,87 (n=3)	225-2500
Укупно	267	100	28,01 ± 0,35 (n=63)	17,8-32,55	831,79 ± 138,2	0-5875

с.г.-стандардна грешка; н.у.-није урађено; n-број оваца за које је одређен посматрани показатељ. Подебљано и подвучено су приказане оцене 4 и 5 (црвено) и оцена 3 (црно).

Графикон 2. Приказ различитих категорија FAMACHA® оцена са бројем оваца по прегледима



*преглед три недеље након третмана

**статистички значајна разлика просечних FAMACHA® оцена пре (јул 2013.) и после примене антихелминтика (август 2013.)



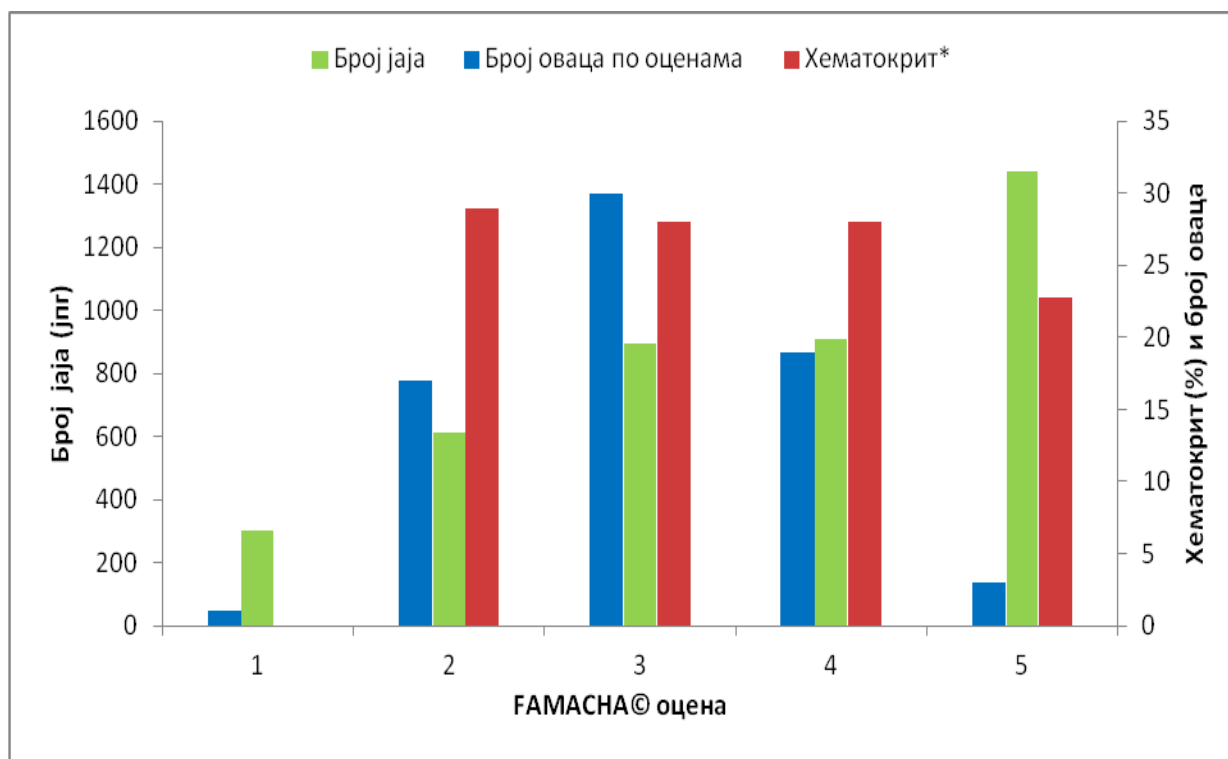


Слика 21. FAMACHA©оцене:
Оцена 2 (лево горе) - лечење није
потребно, ориг.
Оцена 4 (десно горе) - лечење је
потребно, ориг.
Оцена 5 (доле) - лечење је
потребно, ориг.

Третман антихелминтицима у лето 2013. је имао значајан ефекат на промену броја оваца које су имале клинички манифестну анемију забележену FAMACHA© дијаграмом. Код 106 оваца прегледаних 24. јула 2013. године, просечна FAMACHA© оцена је била 4, а код 81 јединке (76,4%) су забележене оцене 4 и 5, што значи да им је несумњиво био потребан третман. Преостали број оваца (25 јединки или 23,6%) је оцењен оценом 3, што значи да процена потребе за третирањем зависи од ситуације у целом запату. С обзиром на налаз клиничке хемонхозе после обдукције угинуле овце 19. јула 2013. (видети касније у овом поглављу), постојао је велики ризик да хемонхоза у кратком временском периоду изазове још угинућа или екстремно исцрпљивање код осталих животиња из запата, па су истог дана све овце третиране клозантелом (96 оваца) или левамизолом (10 оваца). Процена анемије спроведена 23 дана од третмана код 101 овце је показала да се просечна FAMACHA© оцена која је сада била 3 поправила за једну (графикон 2), што је било статистички значајно према резултатима ANOVA теста ($p=0,001$). Животиње су се полако опорављале након лечења, јер је анемија (оцена 4) сада била присутна код 23 овце (22,8%), док оцене 5 није ни било. Претходна провера варијанси урађена помоћу Левеновог теста ($p=0,371$) је показала да се могу упоредити резултати FAMACHA© оцењивања оваца пре и после третмана антихелминтицима ANOVA тестом.

Поред оцењивања помоћу FAMACHA© дијаграма у два наврата у 2014. години (септембар и новембар), урађене су и анализе хематокрита и бројање јаја за сваку прегледану овцу, што је сумирано и графички приказано (Графикон 3).

Графикон 3. Приказ броја оваца, просечног броја јаја и просечне вредности хематокрита по различитим категоријама FAMACHA© оцена



* референтна вредност хематокрита код здравих оваца износи 27-45% (Jackson и Cockcroft, 2002)

Корелација између хематокрита, броја јаја и појединачних FAMACHA® оцена за податке добијене у посматрањима током 2014. године је урађена за 63 овце јер је од 20 узорака крви оваца узетих у новембру 7 коагулисало. Након анализе добијени су негативни Спирманови коефицијенти корелације рангова између вредности хематокрита и FAMACHA® оцена (ниска корелација, $r=0,0541$) и хематокрита и броја јаја (умерена, статистички значајна корелација, $r=0,002$). С друге стране, постоји слаба позитивна корелација између броја јаја и FAMACHA® оцена, али без статистичке значајности ($r=0,4752$) (Табела 8).

Табела 8. Приказ Спирманових коефицијената корелације рангова (r_s), њихових квадрата (r_s^2) и процената (%) са припадајућим p вредностима, за испитивање повезаности између вредности хематокрита, природног логаритма броја јаја и FAMACHA® оцена за 63 овце испитане 2014. године.

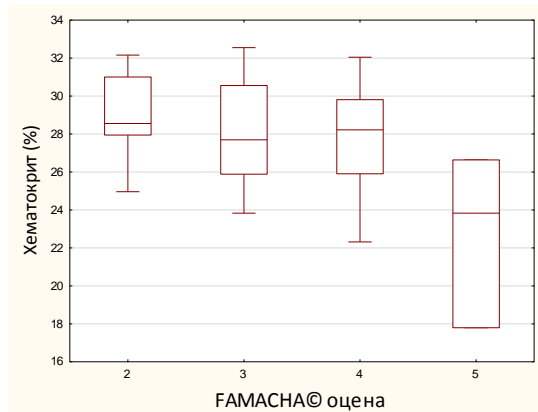
	Хематокрит				Број јаја (FEC log 10)			
	r_s	r_s^2	(%)	p вредност	r_s	r_s^2	(%)	p вредност
FAMACHA® оцена	-0,2446	0,06	6	0,0541	0,0907	0,01	1	0,4752
Број јаја (FEC log 10)	-0,4761	0,23	23	0,0002*	1,000	1,00	1	-
Хематокрит	1,000	1,00	1	-	-0,4761	0,23	23	0,0002*

*означава статистички значајну разлику за ниво значајности $p \leq 0,05$ (црвено, подебљано).

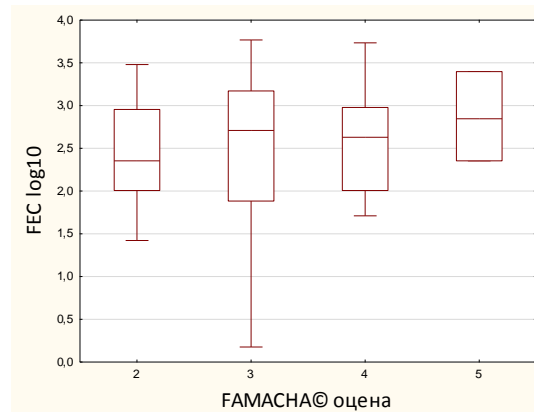
Веза између испитиваних параметара (вредност хематокрита, природан логаритам броја јаја и FAMACHA® оцена) је приказана и графички на Графикону 4.

Графикон 4. Однос између FAMACHA® оцене, вредности хематокрита (γ %) и природног логаритма броја јаја (FEC log10) приказан правоугаоним дијаграмом (Box and Whisker plot).

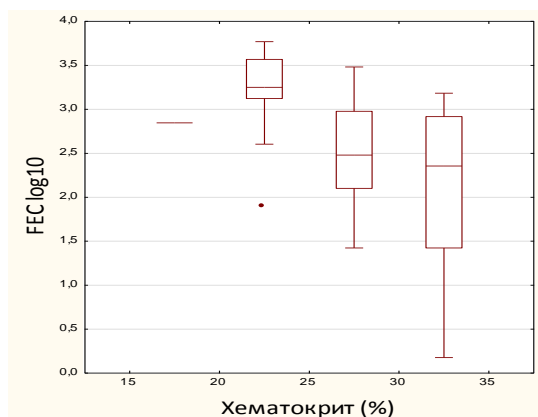
а)



б)



в)



а) Однос FAMACHA® оцена и вредности хематокрита.

б) Однос FAMACHA® оцена и природног логаритма броја јаја.

в) Однос вредности хематокрита и природног логаритма броја јаја.

Линија унутар правоугаоника представља вредност медијане; горња, односно доња страница правоугаоника су 25. односно 75. квартил, а Whisker интервали показују максимум (горњи) и минимум (доњи). Кружићи показују вредности које одступају (outliers) а звездице исте, екстремне вредности (extremes).

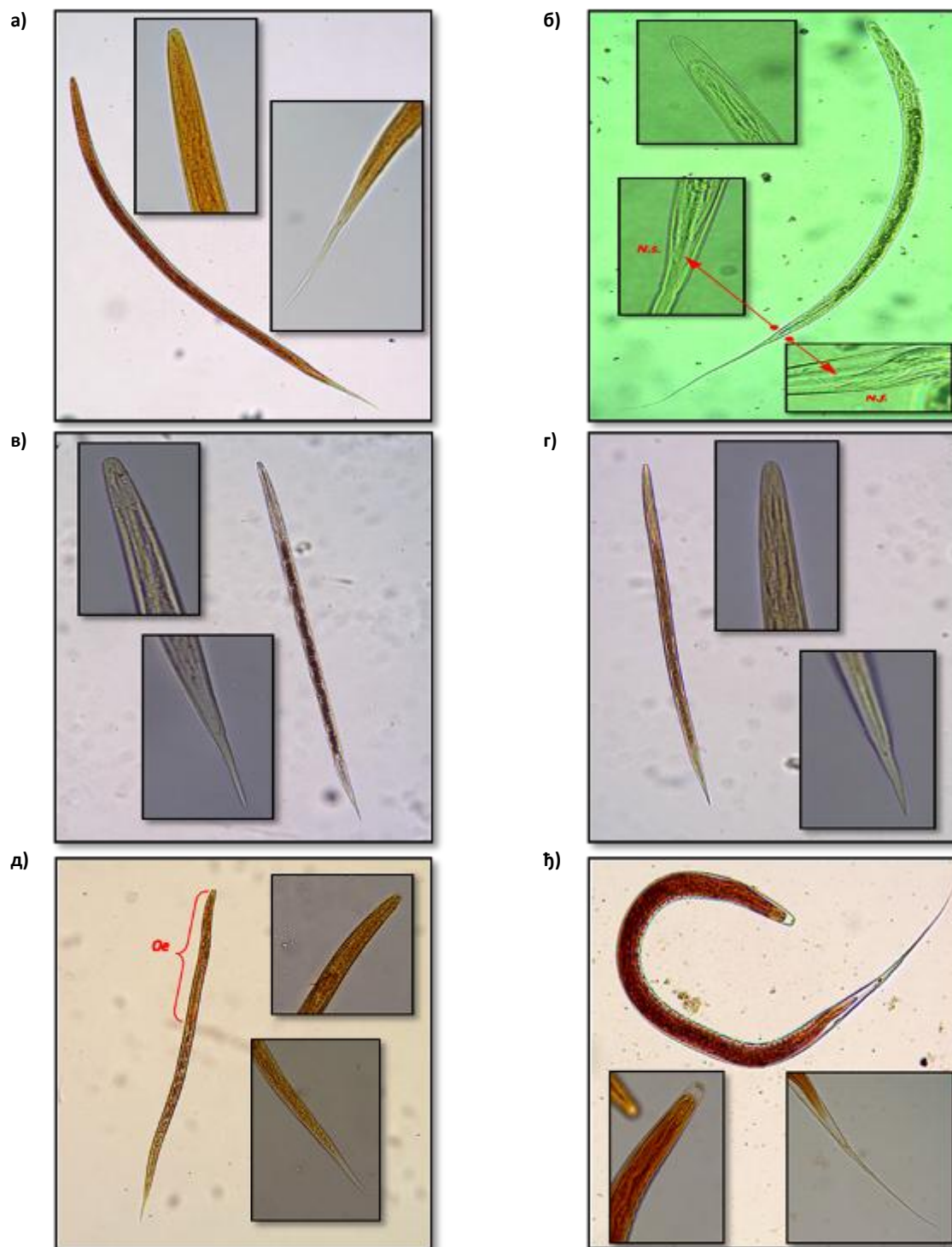
5.2.2. Налази морфолошког испитивања развојних облика желудачно-цревних стронгилида

5.2.2.1. Идентификација инфективних ларвица

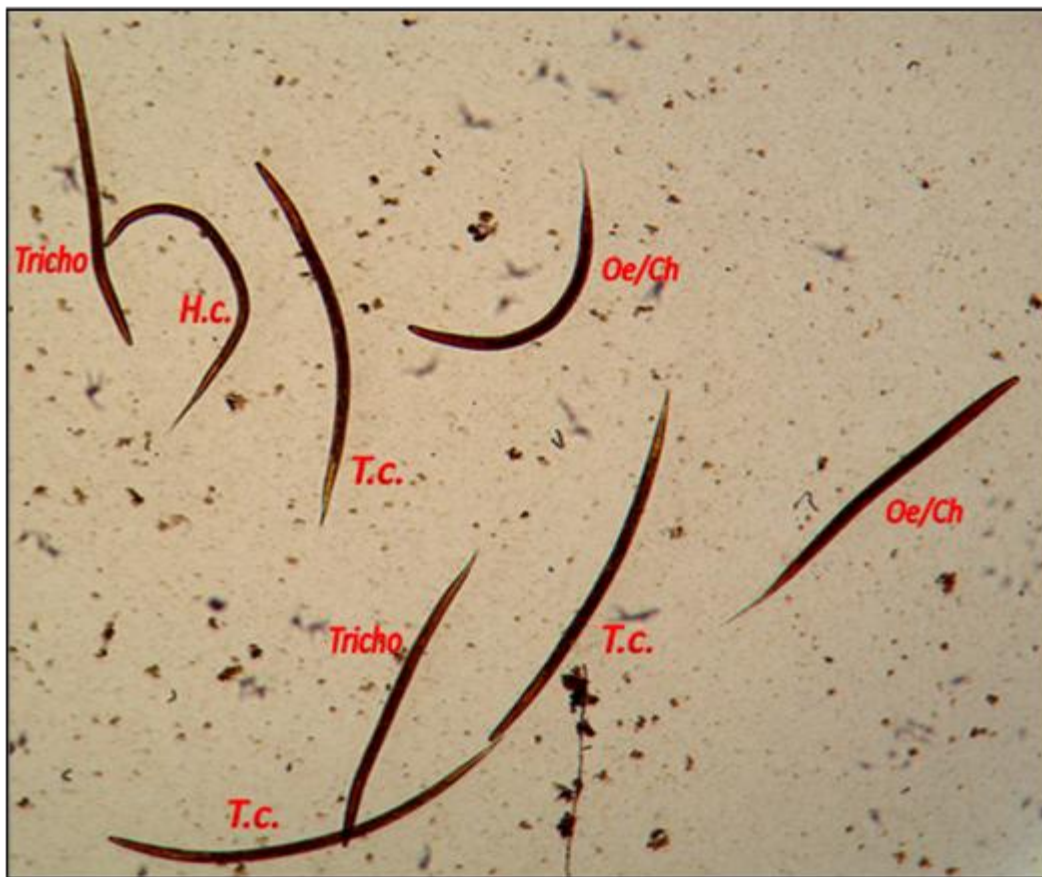
На основу морфологије и морфометрије инфективних ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца, установљено неколико различитих родова/врста (Графикон 5). Однос у величини ларвица за већину најважнијих родова је приказан на слици 22.

Графикон 5. Морфологија инфективних ларвица (Л₃) желудачно-цревних стронгилида оваца.

Приказане су целе Л₃ (увеличање 100х), и морфологија главе и репа на уметцима (увеличање 400х).



Легенда: а) *Haemonchus contortus*; б) *Nematodirus spp.*, *N.s.-N. spathiger*; *N.f.-N. filicollis* ; в) *Teladorsagia circumcinta*; г) *Trichostrongylus spp.*; д) *Strongyloides papillosus*, *Oe* - једњак; *Ch* - родоци *Oesophagostomum/Chabertia*.



Слика 22. Однос величине ларвица за већину најважнијих родова, ориг. (увећање 40х)
Скраћенице: *H.c.* - *Haemonchus contortus*; *T.c.* - *Teladorsagia circumcinta*; *Tricho* - *Trichostrongylus spp.*; *Oe/Ch* - *Oesophagostomum/Chabertia*.

5.2.2.2. Идентификација одраслих паразита и налаз *post mortem* прегледа органа

Након обдукције, испирања сиришта и црева и идентификације одраслих хелмината помоћу расположивих кључева, утврђено је присуство 11 врста желудачно-цревних стронгилида оваца:

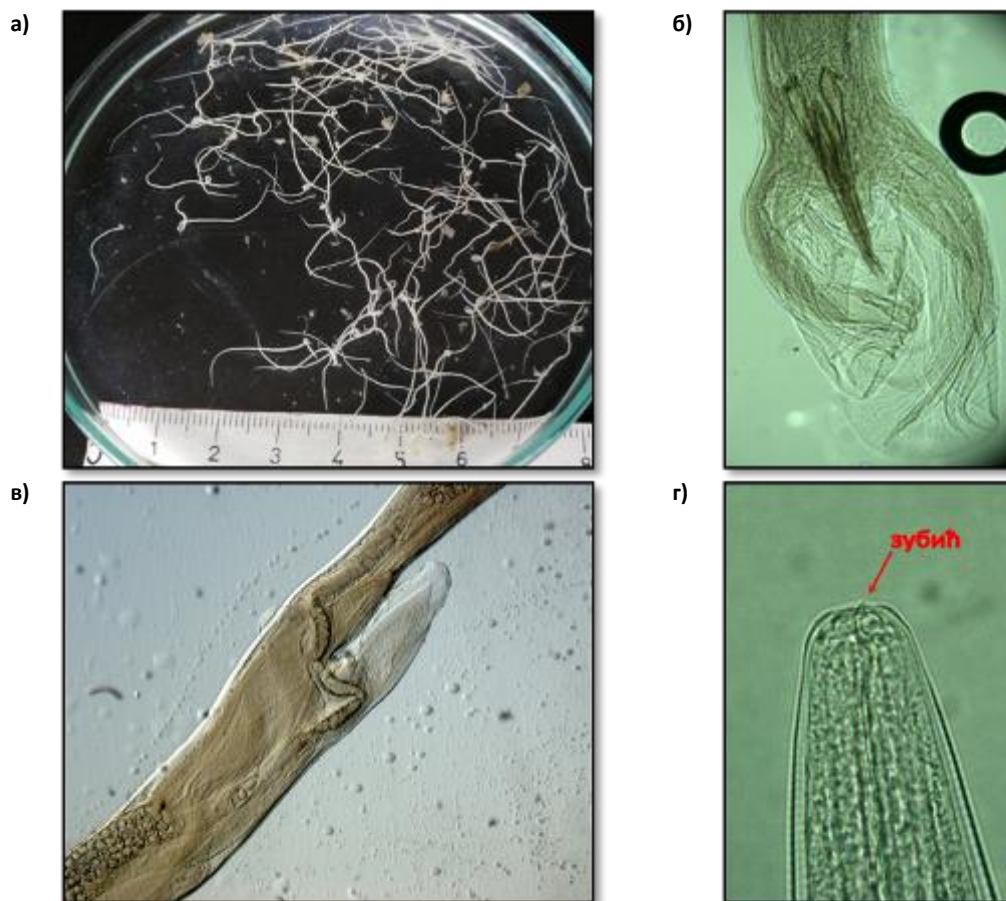
- у сиришту: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcinta* и *Trichostrongylus axei*;
- у танком цреву: *Trichostrongylus colubriformis*, *Nematodirus spathiger*, *Nematodirus filicollis*, *Nematodirus abnormis* и *Strongyloides papillosus*;

- у дебелом цреву: *Chabertia ovina*, *Oesophagostomum venulosum* и *Trichuris discolor*.

Морфолошке особености нађених хелмината карактеристичне за поједине родове, односно врсте, су приказане на Графикону 6.

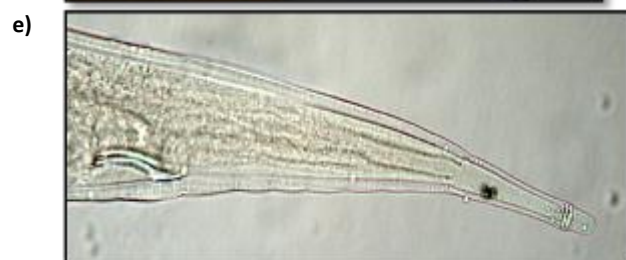
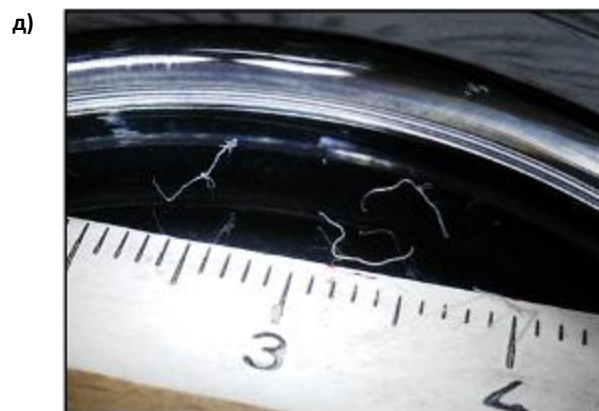
Графикон 6. Морфологија одраслих желудачно-цревних стронгилида оваца.

Приказани су делови хелмината на различитим увећањима (40, 100 и 400х).



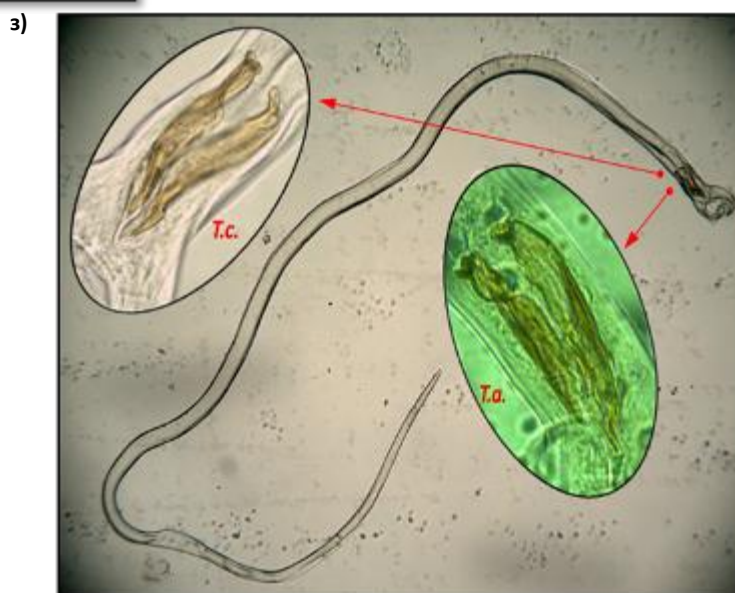
а-г) *Haemonchus contortus*:

а) адулти у природној величини; **б)** копулаторна бурза мужјака (100х); **в)** регион вулве женке (приказан део утеруса, овејектори и вулварни поклопац); **г)** букална чаура адулта са хитинским зубићем (400х).



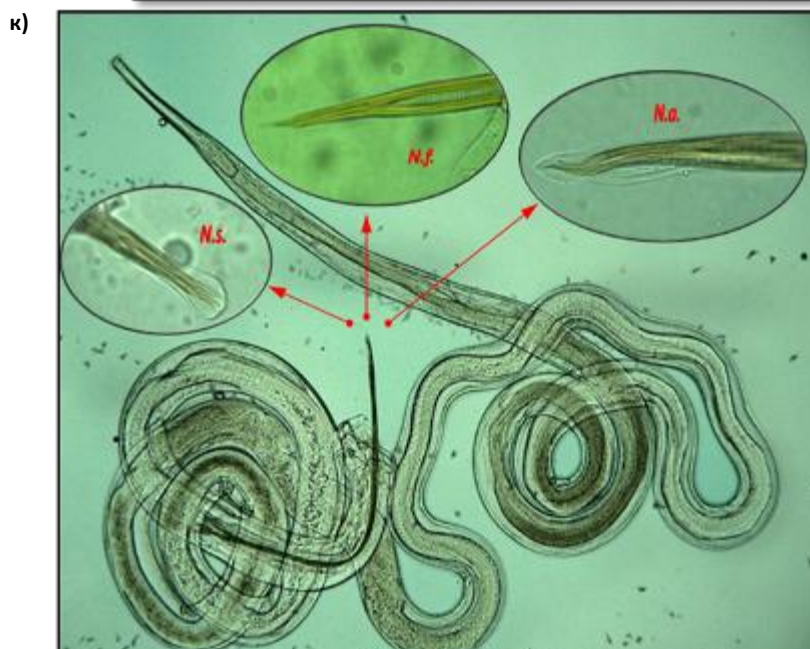
д-е) *Teladorsagia circumcincta*:

д) адулти у природној величини; ђ) копулаторна бурза мужјака (100х); е) задњи крај женке са ануларним прстеновима на врху репа (400х).



ж-з) род *Trichostrongylus*:

ж) адулти у природној величини;
з) одрасли мужјак из танког црева (100х); увећане спикуле приказане на уметцима (400х): **T.a.** - *T. axei* (сириште) и **T.c.** - *T. colubriformis* (танко црево)



j)

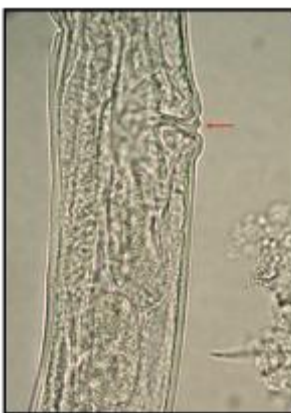
и-к) род *Nematodirus*:

и) адулти у природној величини; j) предњи крај адулта са цефаличном везикулом (400x); к) одрасли мужјак (40x); на уметцима приказан увећан врх спикула различитих врста (400x): *N.s.* - *N.spathiger*, *N.f.* - *N.filicollis*, *N.a.* - *N.abnormalis*

л)



љ)



л-љ) *Strongiloides papillosus* – партеногенетска женка:

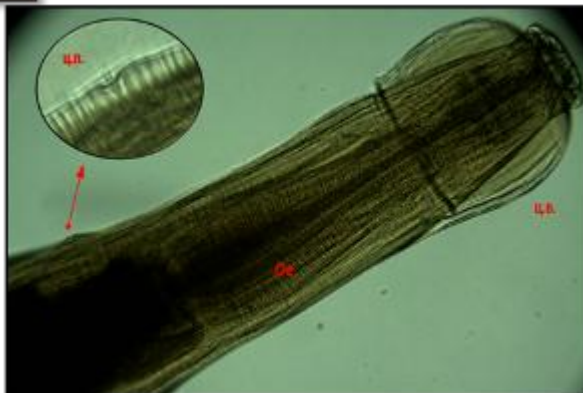
л) предњи крај адулта (100x): *Oe* – једњак

љ) задња трећина тела са јајима у утерусу (400x) – детаљ: дугачка вулва без поклопца (црвена стрелица)

м)



н)

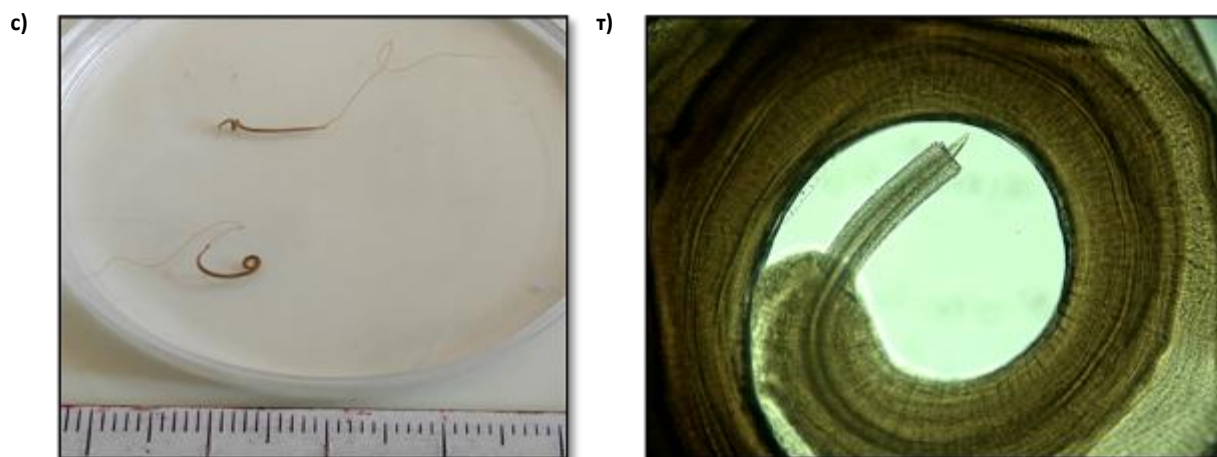


њ)



о)

**м-њ) *Oesophagostomum venulosum*:****м)** адулти у природној величини;**н)** предњи крај адулта (100х). Детаљи: **ц.в.** - цервикална везикула са попречним жљебом; **Ое** - једњак; на уметку је приказана цервикална папила (**ц.п.**) (400х).**њ)** задњи крај мужјака са копулаторном бурзом и спикулама (100х).**о-р) *Chabertia ovina*:****о)** адулти у природној величини;**п)** предњи крај адулта (100х) где је приказана добро развијена букална чаура звонастог облика.**р)** задњи крај мужјака са копулаторном бурзом и спикулама (100х).**п)****р)**



с-т) род *Trichuris*:

с) адулти у природној величини; т) *Trichuris discolor* - задњи крај мужјака (100x) где је приказан омотач спикULE која незнатно промина из њега.

Налази добијени након *post mortem* прегледа неколико испитаних сиришта код обдукованих или закланих оваца су углавном били уредни, уз потпуно одсуство макроскопских промена које могу да буду паразитске етиологије (због одсуства *H. contortus*). С друге стране, забележена је и друга крајност када је обдукована овца угинула због хроничне хемонхозе уз налаз тешког крварења у сиришту услед присуства мноштва одраслих паразита. Било је и случајева одсуства макроскопски видљивих промена на слuzници сиришта упркос присуству одраслих *H. contortus*, а понекад су ови паразити довели до појаве тачкастих крварења на мањем делу слuzнице, док је остатак остао макроскопски непромењен.

Иако је, осим *H. contortus*, било у појединим случајевима и паразита сиришта из родова *Teladorsagia* и *Trichostrongylus*, нису забележене патолошке промене које прате поменуте стронгилиде.

Макроскопски изглед органа оваца који је допуњен описом патоанатомских промена је приказан на графикону 7.

Графикон 7. Макроскопски изглед сиришта са описом патоанатомских промена.



а-б) Спољашњи изглед сиришта прегледаних оваца:

а) Физиолошки налаз, без видљивих промена.

б) Присуство опсежног крварења услед хемонхозе (одрасли паразити се виде на уметку), видљиво споља услед промене боје органа.

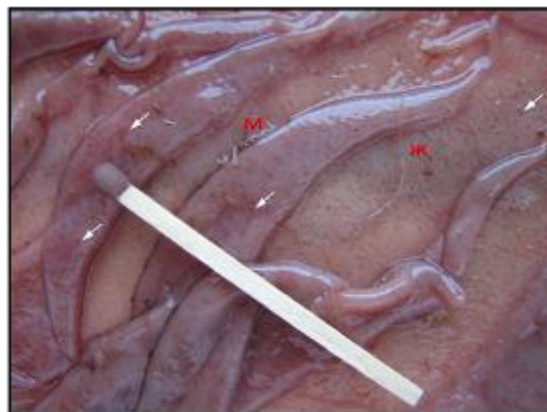


в-г) Унутрашњи изглед сиришта прегледаних оваца:

в) Без промена, одсуство *H. contortus*

г) Крварење сиришта као последица хемонхозе. На уметку приказано клупко одраслих паразита.

Abomasitis haemorrhagica chronica per Haemonchum contortum





д-ж) Изглед слузнице сиришта прегледаних оваца:

д) Физиолошки налаз, слузница розе боје без лезија, одсуство *H. contortus*

ђ) Раширена тачкаста крварења (беле стрелице) по слузокожи сиришта су у овом случају последица деловања *H. contortus* као примарног узрочника (приказани одрасли мужјак (**М**) и женка (**Ж**) у односу на величину палидрвца шибице). Осим њега, пронађено је и мање одраслих *T. circumcinta* и *T. axei*, који су овде од секундарног значаја.

Haemorrhagiae punctatae diffusae abomasi per Haemonchum contortum.

е-ж) Слузница сиришта овце где је било *H. contortus*, без испољене болести. Овца добре телесне кондиције је угинула због тешког јагњења.

е) Налаз *H. contortus* у слузи (врх игле) без макроскопски видљивих промена на слузокожи.

ж) Присуство локализованих тачкастих крварења на слузници сиришта услед хемонхозе (врх игле показује лезије и одраслу женку *H. contortus*). **Haemorrhagiae punctatae localisatae per Haemonchum contortum**

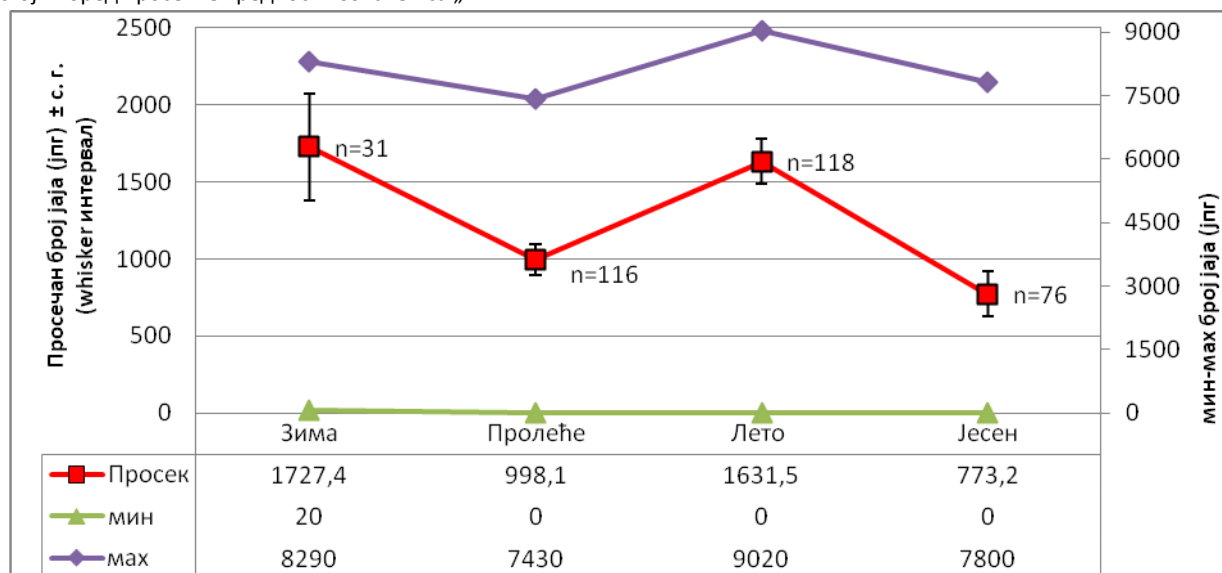
1.1.1. Сезонска динамика и интензитет инвазије желудачно-цревних стронгилида

За приказ овог дела резултата су изабрани копролошки прегледи који су вршени у групама од најмање 10 оваца. Тако је током свих година истраживања на газдинству приказан налаз за укупно 341 овцу. Просечан број јаја желудачно-цревних стронгилида (\pm с.г.) је био $1233,5 \pm 78,6$ јпг, а распон боја јаја се кретао од 0-9020 јпг. Што се тиче рода *Nematodirus*, укупан просечан број јаја (\pm с.г.) је, у складу са очекивањима, био мањи и износио је $23,5 \pm 2,9$ јпг (распон 0-390 јпг).

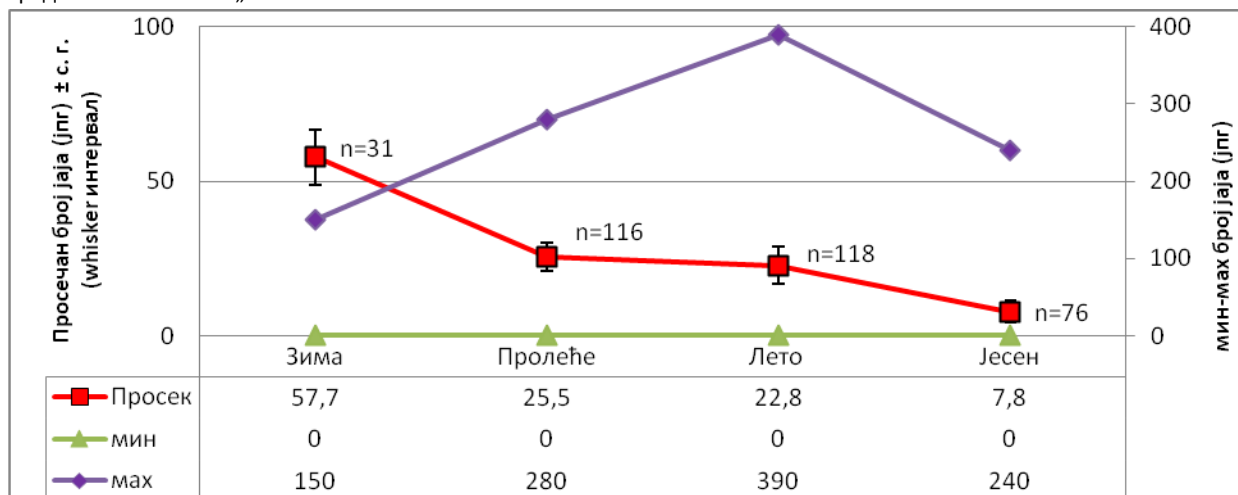
Значајно је нагласити да је пронађен један екстрем који се односи на (већ поменуто) овцу која је угинула од хроничне хемонхозе у јулу 2013. године (фотографије на Графикону 7) а није урачунат у приказани просек броја јаја, где је укупан број јаја желудачно-цревних нематода процењен на преко 67000 јпг (стронгилидна јаја 64737 јпг; *S. papillosus* 933 јпг; *Nematodirus spp.* 600 јпг и *Trichuris spp.* 1000 јпг).

Сезонска динамика јаја за 341 овцу је груписана спрам датума узорковања по годишњим добима (зима, пролеће, лето и јесен) и графички приказана посебно за стронгилиде и *Nematodirus spp.* на Графиконима 8 и 9.

Графикон 8. Сезонска динамика излучивања јаја желудачно-цревних стронгилида (без рода *Nematodirus*) на фарми посматрана кроз четири годишња доба. Приказан је просечан број јаја (\pm с.г. - стандардна грешка, Whisker интервали) са минималним и максималним вредностима (мин-мах) за свако годишње доба. Доле у табели су дате нумеричке вредности графички приказаних података. Број оваца прегледаних у свакој сезони стоји поред просечне вредности означен са „n“.



Графикон 9. Сезонска динамика излучивања јаја паразита из рода *Nematodirus* на фарми посматрана кроз четири годишња доба. Приказан је просечан број јаја (\pm с.г. - стандардна грешка, Whisker интервали) са минималним и максималним вредностима (мин-мах) за свако годишње доба. Доле у табели су дате нумеричке вредности графички приказаних података. Број оваца прегледаних у свакој сезони стоји поред просечне вредности означен са „n“.



На основу резултата идентификације инфективних ларвица, који се базирају на просечној вредности 15 урађених копрокултура, јасно је да током целе године на имању углавном доминира

Haemonchus contortus са преко 70%, за њим следи *Trichostrongylus spp.* са близу 18%, па родови *Oesophagostomum/Chabertia* са око 7%, док је *Teladorsagia circumcincta* у копрокултури била најмање заступљена са приближном вредности од скоро 3%. У Табели 9 су приказане тачне просечне вредности укупне популације ларвица стронгилида уз податке о просечним вредностима груписане по годишњим добима (са распонима који су забележени за сваки род појединачно). Постоји ограничење у интерпретацији заступљености ларвица желудачно-цревних стронгилида у зимском периоду, јер је популација ларвица идентификована само једном приликом. Код осталих годишњих доба су посматрања урађена током најмање две различите године за неколико различитих група оваца у одговарајућим месецима.

Табела 9. Сезонска динамика инфективних ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца.

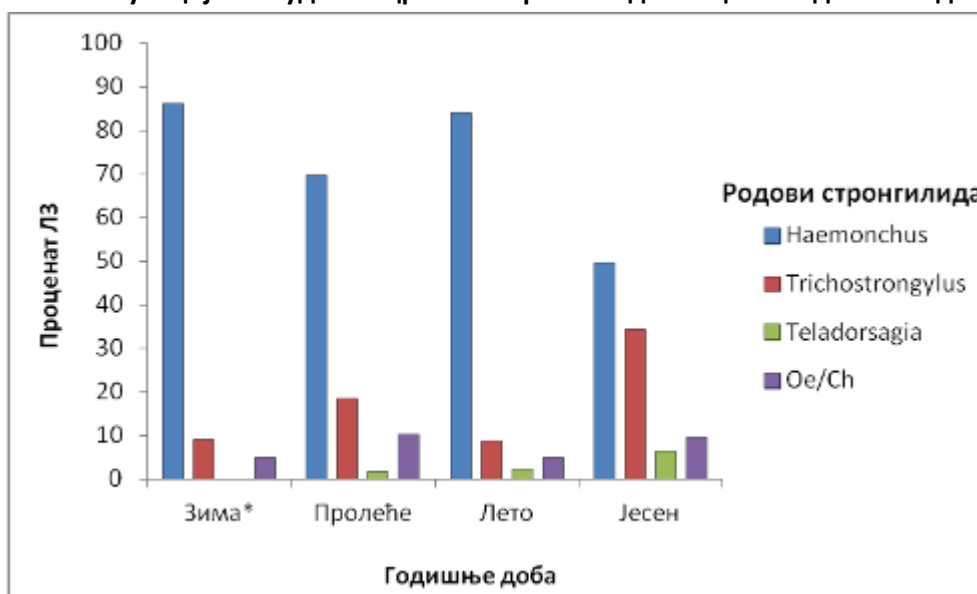
Приказана је укупна вишегодишња просечна вредност популације ларвица на газдинству, са просецима (и одговарајућим распоном) за свако годишње доба појединачно. У последњем реду табеле је назначено колико различитих година и култура је прегледано и урачунато у просек.

Род стронгилида	Популација ларвица стронгилида (у %) по годишњим добима						Укупни просек (%)	
	Зима*	Пролеће (+распон)		Лето (+распон)		Јесен (+распон)		
<i>Haemonchus sp.</i>	86	70	(29-92)	84	(64-94)	50	(15-70)	72,3
<i>Trichostrongylus spp.</i>	9	18	(5-34)	9	(2-19)	34	(14-46)	17,6
<i>Teladorsagia spp.</i>	0	2	(0-7)	2	(0-12)	7	(0-14)	2,7
<i>Oe/Ch</i>	5	10	(1-30)	5	(4-6)	10	(0-31)	7,5
Године+број култура	1+1	2+5		2+5		4+4		Укупно 15 култура.

*доступна само једна култура за зимско годишње доба, па није објективан показатељ популације стронгилида у том периоду!

Графички приказ сезонске динамике појединих родова стронгилида по годишњим добима, поједностављује упоређивање популације присутне у овцама на имању током године (Графикон 10).

Графикон 10. Популација желудачно-цревних стронгилида оваца по годишњим добима.



*доступна само једна култура за зимско годишње доба, па није објективан показатељ популације стронгилида у том периоду!

Haemonchus contortus је најбројнија врста стронгилида на имању, присутна је у свим годишњим добима, доминира у пролеће, пик достиже током лета, а опада у јесен. У оквиру сваког годишњег доба постоје значајна варирања у његовој популацији у овцама, што је условљено стањем домаћина и временским приликама (доминантна врста током 2012. и 2013., које су биле топлије године). Врсте из рода *Trichostrongylus* су најбројније после *Haemonchus*-а у распону од 2-46% у зависности од годишњег доба. Најзаступљеније су у деловима године са умеренијом температуром – у пролеће (мање) и јесен (више), док су преко лета мање присутне. Родови *Oesophagostomum/Chabertia* су током година били заступљени у културама до 9%, до 2015. када је у просеку неких месеци (мај и октобар) било и до 30% ларвица из ових родова. Према укупним просецима, подједнако су бројни у пролеће и јесен, док им преко лета бројност опада. Најмање заступљен род на имању је *Teladorsagia*, који је на основу резултата подједнако био заступљен у пролеће и лето, док је највише ових паразита било у јесен. Као и код претходних, и код овог рода постоје значајне варијације у популацији у оквиру појединих годишњих доба, опет условљених временским приликама (нижом температуром и обилнијим падавинама). Због наведених ограничења везаних за зиму, популација стронгилида је изостављена из детаљније анализе сезонске динамике.

Интензитет инвазије паразитима оваца је одређен комбинацијом података о броју јаја и популацији врста током године. Како је при сваком прегледу копрокултуре проналажена мешовита популација стронгилида уз присуство (и често доминацију) врсте *Haemonchus contortus*, тако је коришћен критеријум Abbott-а и сар. (2009) где је налаз до 500 јпг означавао низак, 500-1500 јпг умерен и преко 1500 јпг висок ниво инвазије. За род *Nematodirus* налаз је класификован према критеријуму који су предложили Taylor и сар. (2007) (Табела 5).

Свега око 4% од укупно прегледаних оваца је током испитивања било негативно на налаз јаја стронгилида. Нешто више од трећине оваца је имало низак ниво инвазије, док је и умерен и висок ниво инвазије био око 30% за оба критеријума. Уз ове податке, број оваца у односу на ниво инвазије за различита годишња доба је приказан табеларно (Табела 10).

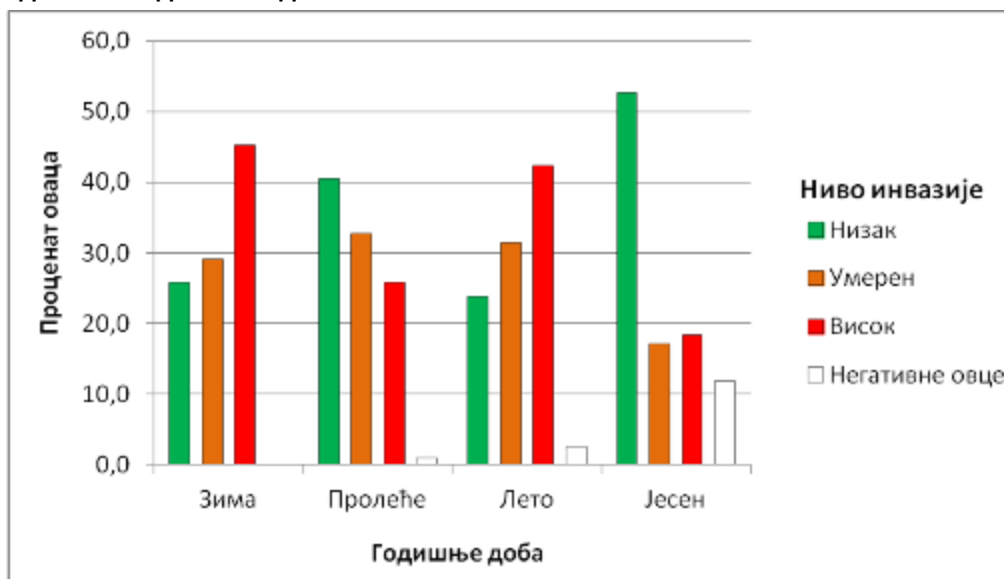
Табела 10. Интензитет инвазије желудачно-цревним стронгилидама оваца.

Приказан је просечни број оваца за поједине категорије (негативне овце; низак, умерен и висок ниво инвазије) за укупни период испитивања, као и по годишњим добима. Умерен (црвени бројеви) и висок ниво инвазије (црвени подвучени бројеви) су посебно означени.

Ниво инвазије	Број оваца инвадираних стронгилидама по годишњим добима				Укупно (%)	
	Зима	Пролеће	Лето	Јесен		
Негативне	0	1	3	9	13	(3,8)
Низак	8	47	28	40	123	(36,1)
Умерен	9	38	37	13	97	(28,4)
Висок	14	30	50	14	108	(31,7)
Укупно	31	116	118	76	341	(100)

Процентуално, највише оваца са високим нивоом инвазије желудачно-цревним стронгилидама (преко 40%) је било у зиму и лето, мање у пролеће а најмање у јесен (Графикон 11). Умерен ниво инвазије је скоро уједначен током године (око 30%) осим у јесењем периоду, када је био скоро упола мањи од осталих годишњих доба. Највише оваца са ниским нивоом инвазије, као и негативних оваца, је било у јесењем периоду, и то укупно преко 60%; то су животиње које није потребно третирати антихелминтицима у моменту прегледа. У периоду пролећа, тај проценат је преко 40, док је у зиму и лето било око 25% оваца које су биле негативне или су имале низак ниво инвазије.

Графикон 11. Приказ процента оваца у односу на ниво инвазије желудачно-цревним стронгилидама по годишњим добима.



Налаз у односу на интензитет инвазије је много повољнији за род *Nematodirus* где је више од 65% оваца је током прегледа било негативно. Скоро уједначен је проценат оних са ниским нивоом (око 16%) и умереним нивоом инвазије (око 18%), док ниједна овца није имала висок ниво инвазије паразитима из овог рода.

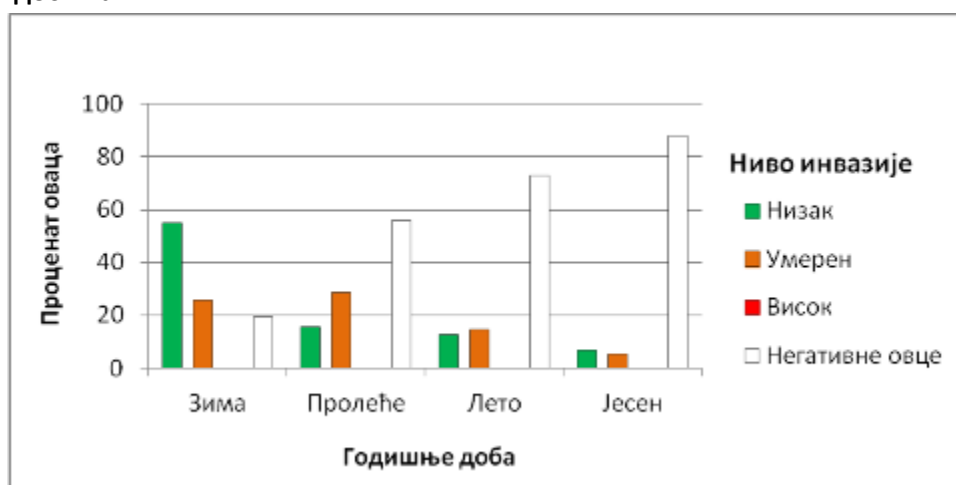
Табела 11. Интензитет инвазије оваца са *Nematodirus spp.*

Приказан је просечни број оваца за поједине категорије (негативне овце; низак, умерен и висок ниво инвазије) за укупни период испитивања, као и по годишњим добима. Умерен (црвени бројеви) и висок ниво инвазије (црвени подвучени бројеви) су посебно означени.

Ниво инвазије	Број оваца инвадираних са <i>Nematodirus spp.</i> по годишњим добима				Укупно (%)	
	Зима	Пролеће	Лето	Јесен		
Негативне	6	65	86	67	224	(65,7)
Низак	17	18	15	5	55	(16,1)
Умерен	8	33	17	4	62	(18,2)
Висок	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	(0)
Укупно	31	116	118	76	341	(100)

Проценат оваца са позитивним налазом јаја *Nematodirus spp.* је највећи у зиму (око 80%), и прогресивно се смањује од пролећа (43,9%) и лета (око 27%) ка јесени (око 12%) (Графикон 12). Од тога, број оваца које имају низак ниво инвазије је највећи у зимском периоду (више од половине) и смањује се ка јесени где је, у просеку, близу 7%. Умерен ниво инвазије је нешто више од четвртине оваца имало у пролеће и зиму, док од лета тај проценат лагано опада да би у јесен био најмањи.

Графикон 12. Приказ процента оваца у односу на ниво инвазије са *Nematodirus spp.* по годишњим добима.



5.3. Изглед ама за скупљање измета оваца

Ам се састоји из три дела: основе, огрлице и кесе за скупљање измета (слика 23). Ам се поставља на овцу тако да се огрлица провуче кроз предњи крај основе, подеси тако да животињи не отежава дисање, регургитацију и гутање хране и закопча око врата (слика 23). Основа се пружа дуж леђа. Од њеног задњег краја полазе два каиша на које се, помоћу дугмади, качи кеса за скупљање измета.

Ти каишеви се пружају са унутрашње стране бутине и копчају се у слабинској регији са основом помоћу два каиша која су попречно постављена у нивоу кукова. Платнена кеса се поставља на крају, тако да се реп провуче кроз посебно просечен отвор и сва дугмад закопчају. Када се правилно постави, доњи крај кесе налаже на базу вимена не притискајући га.

Приликом дефекације, сав измет остаје у кеси. Мокраћа се након уринирања исцеди из кесе и нема утицаја на скупљање измета.



Слика 23. Горе лево: делови ама: огрлица (1), основа (2) и кеса за скупљање измета (3). Горе десно: изглед ама на овци, ориг.



Слика 24 (лево): Положај кесе за скупљање измета на овци, ориг.

Слика 25 (десно): Положај ама и каишева у односу на базу вимена, ориг.



Слика 26. Горе лево: изглед ама са скупљеним узорком. Горе десно: узорак измета у аму, ориг.

Постављањем овако дизајнираног ама је током свих огледа успешно скупљан измет оваца за различите потребе. У зависности од динамике дефекације, ам је на животињама био и по неколико сати. Непосредно након постављања ама, овце су показивале знаке страха и узнемености покушавајући да се ослободе и побегну, али су се врло брзо навикле и без икаквих проблема наставиле да се хране и одмарају.



Слика 27. Горе (лево и десно): овце које се хране током ношења амова за скупљање измета, ориг.

5.4. Испитивање ефикасности ивермектина

5.4.1. Резултати почетних испитивања ефикасности ивермектина урађених 2012. године

Просечна FEC вредност за Т групу је износила 3641 јпг, а за контролну 1483 јпг на „Дан 0“. Резултати АНОВА теста су показали да постоји статистички значајна разлика између просечних FEC вредности две групе нултог дана ($p=0,0004$). Због нехомогености испитиваних група, приказани су само резултати FECR теста израчунати формулом 2 (McKenna, 2006) за овце из третиране групе. Подаци о броју јаја оваца из контролне групе нису употребљени у калкулацији.

Укупна редукција јаја стронгилида је била 99 % (95% ИП: 97-100). Према критеријумима WAAVP, ови резултати указују да не постоји сумња на резистенцију и да је ефикасност ивермектина одлична. Ипак, налаз јаја након бројања спроведеног 14-ог дана после третмана (копролошки позитивно 7 оваца) указује на постојање популације паразита који могу бити резистентни на ивермектин, у нивоу који није занемарљив код појединих оваца. Двадесетдевет дана после третмана, повећао се број копролошки позитивних оваца на 12, уз промену нивоа јаја код дела животиња (Табела 12).

Табела 12. Вредности јпг стонгилида током трајања првог огледа испитивања ефикасности ивермектина (Црвени бројеви у табели представљају налаз броја јаја код седам оваца у огледној групи 14. дана, односно 29. дана након лечења. Подвучени бројеви означавају налаз преко 100 јпг. Контролна група је приказана ради илустрације природног варирања броја јаја код оваца током времена.)

Р.бр.	Огледна група – налаз (јпг)			Контролна група – налаз (јпг)		
	0.дан (Т1)	14. дан (Т2)	29. дан (Т3)	0. дан (К1)	14. дан (К2)	29. дан (К3)
1	2740	0	10	800	1530	1820
2	2160	0	10	1230	1200	930
3	5120	30	80	1530	2040	1640
4	3970	<u>220</u>	<u>160</u>	770	1520	2600
5	2060	50	<u>110</u>	2470	2610	2990
6	3420	0	20	680	1230	950
7	3930	0	0	3350	5160	4260
8	2160	0	10	650	940	1270
9	4790	0	10	660	490	420
10	3800	70	10	1260	1550	2710
11	5840	20	40	1110	1590	1410
12	1440	0	0	3260	3880	6570
13	660	0	0	1510	2630	2040
14	3510	10	10	2430	4470	1590
15	9020	<u>200</u>	<u>350</u>	540	2100	3210

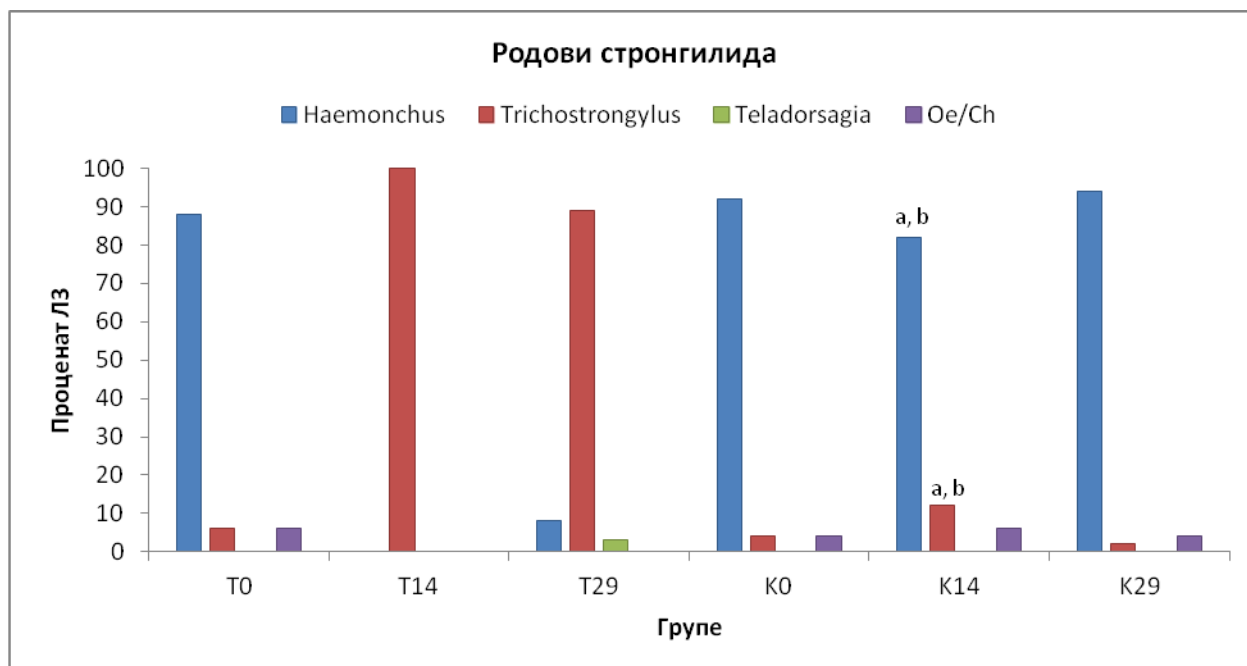
Када је у питању *Nematodirus* spp., примећено је да је код три третиране овце након 14-ог дана било јаја, с тим што је код две јединке дошло до повећања јпг у односу на број јаја пре третмана. Двадесетдевет дана после третмана, број оваца са јајима *Nematodirus* spp. је био 4, уз две ново позитивне животиње и негативан налаз код једне од претходно позитивних (табела 13). Већина оваца није имала препоручени ниво јпг за FECRT, па калкулација није урађена. Због чињенице да су јаја *Nematodirus* spp. уопште пронађена у измету оваца након третмана ивермектином постављена је само сумња на постојање резистенције, са задатком касније провере.

Пре дехелминтизације ивермектином, проценат идентификованих ларвица различитих родова стронгилида је био уједначен у обе групе, без статистички значајне разлике. У обе групе су идентификовани родови *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, и *Oesophagostomum/Chabertia*. Након дехелминтизације, у третираној групи су 14-ог дана идентификоване ларвице само из рода *Trichostrongylus*. Двадесетдевет дана после дехелминтизације, су у огледној групи поред рода *Trichostrongylus* идентификоване и ларвице *H. contortus* и *T. circumcincta*. Како су овце током трајања огледа све време биле затворене и храњене на начин који онемогућава реинфекцију инфективним ларвицама, налаз нових родова стронгилида сугерише да су ларвице које су се налазиле до тада у сиришту у ЕЛ₄ стадијуму (у хипобиози) наставиле свој развој након елиминације значајног дела одраслих паразита. Уз мање изузетке, популација ларвица унутар К групе је током времена углавном била уједначена, што је, уз остале налазе, илустровано на Графикону 13.

Табела 13. Вредности јпг *Nematodirus* spp. током трајања првог огледа испитивања ефикасности ивермектина. (Црвени бројеви у табели представљају налаз јаја код оваца у огледној групи 14. дана, односно 29. дана након лечења. Подвучени бројеви означавају повећање у броју јаја. Контролна група је приказана ради илустрације природног варирања броја јаја код оваца током времена.)

Р.бр.	Огледна група – налаз (јпг)			Контролна група – налаз (јпг)		
	0.дан (Т1)	14. дан (Т2)	29. дан (Т3)	0. дан (К1)	14. дан (К2)	29. дан (К3)
1	10	<u>60</u>	<u>70</u>	0	0	10
2	10	0	0	220	160	240
3	150	0	<u>20</u>	0	0	0
4	30	<u>110</u>	<u>120</u>	0	0	0
5	320	<u>30</u>	0	50	0	0
6	0	0	0	60	300	10
7	40	0	0	0	0	0
8	10	0	0	0	0	180
9	0	0	0	0	0	10
10	390	0	0	0	0	0
11	70	0	0	30	0	0
12	0	0	0	20	20	10
13	90	0	0	10	0	0
14	0	0	0	20	20	30
15	20	0	<u>70</u>	0	0	0

Графикон 13. Проценат заступљености различитих родова стронгилида у испитиваним групама током времена. Различита слова означавају статистички значајну разлику између популације ларвица на нивоу значајности 95% ($p \leq 0.05$), где постоји разлика у односу на К групу 0. дан (а) и К групу 29. дан (b).



5.4.2. Ефикасност ивермектина против желудачно-цревних стронгилида у испитивањима током 2013. године

5.4.2.1. Ефикасност ивермектина против *Nematodirus* spp.

Слаба ефикасност ивермектина против *Nematodirus* spp. је забележена након двократног третмана. Процент редукције је био 74 % (95% ИП: 38-89). Девет од четрнаест третираних оваца је избацивало јаја *Nematodirus*-а двадесетог дана након лечења, у распону од 10 до 60 јпг. Како није урађена идентификација инфективних ларвица *Nematodirus*-а, не може се говорити о врсти која је преживела третман у моменту испитивања ефикасности препарата. Тако је идентитет *Nematodirus*-а остао познат само до нивоа рода. Такође, према подацима из доступне литературе, овај резултат представља први налаз слабе ефикасности ивермектина против паразита оваца из рода *Nematodirus* у нашој земљи.

5.4.2.2. Ефикасност ивермектина против осталих стронгилида

Просечан број јаја нултог дана у посматраним групама је био неуједначен, у распону од 1233-2090 јпг. Без обзира на то, резултати АНОВА теста су показали да не постоји статистички значајна разлика између просечног броја јаја пред почетак појединачних FECR тестова ($p=0,9123$) и да се тако ефикасности различитих препарата могу упоредити.

Испитивани препарати ивермектина су показали сличан ниво ефикасности против желудачно-цревних стронгилида на имању, у распону од 92-98%, али без статистички значајне разлике између различитих препарата ($p=0,270$) (Табела 14). Према критеријумима WAAVP, на основу редукције јаја код једног препарата се може посумњати на резистенцију, а код другог прогласити резистенција. Међутим, на основу добијених резултата није било могуће са сигурношћу прогласити резистенцију, него је уместо тога налаз окарактерисан као прелиминарни доказ о постојању резистенције на ивермектин (Симин и сар, 2014). Инфективне ларвице идентификоване након третмана у свим групама припададе су роду *Trichostrongylus*.

Табела 14. Резултати FECR тестова за 5 комерцијалних препарата ивермектина. Приказани су: назив препарата; датум апликације лека; просечан број јаја са распоном (јпг) (14. дан); проценат редукције јаја (ПР); 95% интервали поверења (95% ИП) и статус резистенције (АР).

Препарат	Датум третмана	Просечан број ЈПГ	(распон)	ПР (%)	95 % ИП	АР
Ivermectin-S®	20.03.13.	45	(0-230)	97	92-99	Осетљив
Promectine®	28.03.13.	109	(0-460)	92	80-97	Резистентан
Alfamec 1%®	09.04.13.	80	(30-160)	96	92-98	Осетљив
Neomectin®	09.04.13.	43	(0-230)	98	92-99	Осетљив
Pandex 1%®	29.04.13.	86	(0-490)	96	86-99	Сумња на резистенцију

5.4.3. Ефикасност ивермектина против желудачно-цревних стронгилида у испитивањима током 2015. године

5.4.3.1. Мај 2015. Године

Резултати четири истовремено урађена FECR теста за процену ефикасности ивермектина показали су да постоји резистенција у свим испитиваним групама. Забележени су различити проценти редукције јаја, у распону од 67-92%, уз постојање статистички значајне разлике у ефикасности лечења између група ($p=0.001$). Детаљни резултати FECR тестова су приказани у Табели 15.

Инфективне ларвице *Trichostrongylus* spp., *T. circumcincta* и *H. contortus* су идентификоване у културама постављеним након третмана. Израчунавање ефикасности против појединих родова је показало да за род *Trichostrongylus* постоји резистенција на ивермектин у свим испитиваним групама, а да је *T. circumcincta* била резистентна у једној групи. За *H. contortus*, постављена је сумња на резистенцију у једној од испитиваних група (Табела 16). Инфективне ларвице из родова *Oesophagostomum/Chabertia* нису пронађене и идентификоване у културама постављеним четрнаестог дана, ни у популацији ларвица третираних група ни у контролној групи. Ефикасност

ивермектина против родова *Oesophagostomum/Chabertia* зато није израчуната, и сматра се да су ови родови потпуно осетљиви на ивермектин у моменту испитивања.

Табела 15. Укупна ефикасност ивермектина против желудачно-цревних стронгилида оваца.

Приказани су: n-број оваца у групи (14. дан); просечан број јаја са распоном (jпг) (14. дан); проценат редукције јаја (ПР) (појединачно упоређен); 95% интервали поверења (95% ИП) и статус резистенције (АР). Број јаја у контролној групи (К) је приказан ради поређења. Различита слова означавају статистички значајну разлику ($p \leq 0.05$) у односу на: T₂ групу (а), T₃ (b), T₁ (c), T₄ (d).

Група	n	Просечан број ЈПГ	(распон)	ПР (%)	95 % ИП	АР
T ₁	9	76	(0-195)	90 ^{a, b}	79-96	Резистентан
T ₂	9	262	(5-800)	67 ^{c, d}	16-87	Резистентан
T ₃	9	171	(10-915)	79 ^{c, d}	24-94	Резистентан
T ₄	7	65	(0-250)	92 ^{a, b}	72-98	Резистентан
К	10	801	(145-1795)	-	-	-

Забележена је варијабилност у генеричком саставу популације ларвица стронгилида између група (третиране и контролна, осим групе T₄) након културе постављене нултог дана. Што се тиче различитих родова, само за род *Haemonchus* није било статистички значајне разлике у проценту ларвица између група ($p=0.272$). Међутим, проценат развијених ларвица других родова/врста желудачно-цревних стронгилида је значајно варирао између испитиваних група, јер је забележена статистички значајна разлика за популацију ларвица *Trichostrongylus* spp. ($p=0.005$), *Teladorsagia* spp. ($p=0.022$) и *Oesophagostomum/Chabertia* ($p=0.001$). Резултати упоређивања процента развоја инфективних ларвица појединих родова желудачно-цревних стронгилида оваца су приказани на Графикону 14.

Табела 16. Ефикасност ивермектина против појединих родова стронгилида оваца. Приказани су: генерички састав инфективних ларвица (14. дана) третираних (Т) група и контролне (К) групе изражен у процентима (%Л₃); проценат редукције јаја (ПР) за сваки род; 95% интервали поверења (95% ИП) и статус резистенције (АР).

Група	Род стронгилида											
	<i>Haemonchus</i> sp.				<i>Trichostrongylus</i> spp.				<i>Teladorsagia</i> spp.			
	% Л ₃	ПР (%)	95% ИП	АР	% Л ₃	ПР (%)	95% ИП	АР	% Л ₃	ПР (%)	95% ИП	АР
T ₁	0	100	0-100	О	100	80	54-91	Р	0	100*	0-100	О
T ₂	2	99	97-99	О	97	33	0-74	Р	1	93	83-97	Р
T ₃	7	97	89-99	СР	93	58	0-88	Р	0	100*	0-100	О

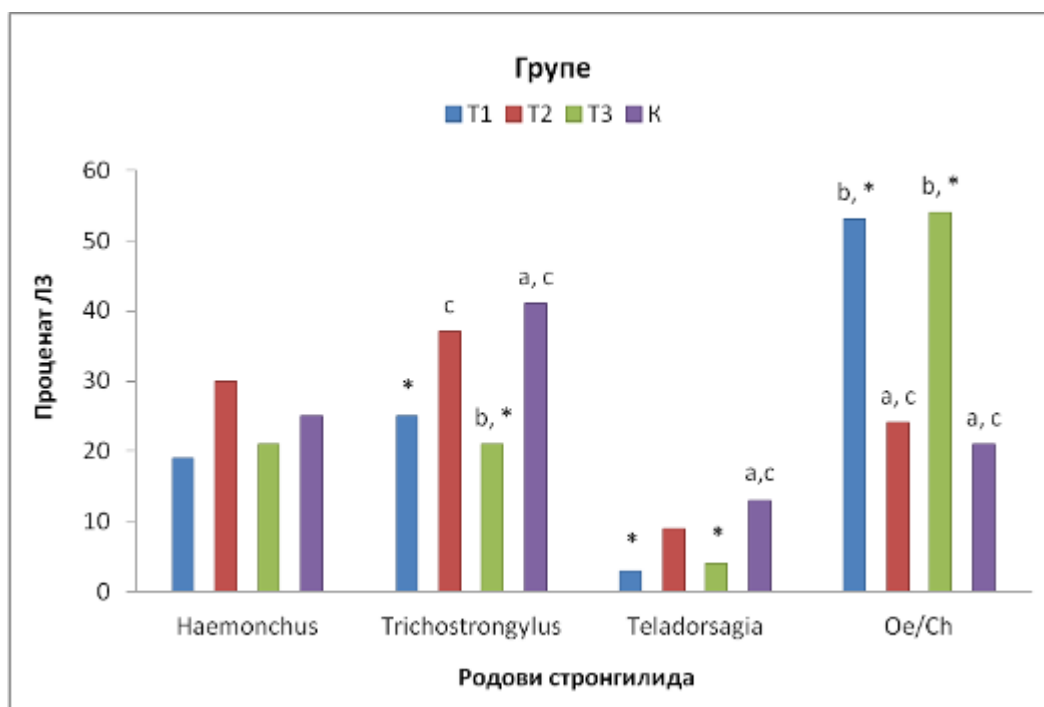
К 48 - - - 47 - - - 5 - - -

О-осетљив; СР-сумња на резистенцију (подебљано); Р-резистентан (подебљано).

*неадекватна заступљеност рода за FECRT због броја јаја мањег од 50 јпг нултог дана (27 јпг за T₁ и 34 јпг за T₃).

Резултати FECR теста као и 95% ИП су ипак приказани у табели.

Графикон 14. Проценат заступљености различитих родова стронгилида у испитиваним групама (без T₄) након културе постављене нултог дана. Различита слова и звездица означавају статистички значајну разлику између група на нивоу значајности 95% ($p \leq 0.05$), где постоји разлика у односу на T₁ групу (a); T₂ групу (b); T₃ групу (c); K групу (*).



5.4.3.2. Октобар 2015. године

Просечан број јаја у 29 оваца је био 1058 јпг са распоном од 0-7800 јпг. Код четири овце није пронађено ниједно јаје стронгилида. На основу резултата бројања јаја, 16 оваца је имало FEC вредност мању од 500 јпг, односно низак ниво инвазије, што значи да више од половине (55,2 %) од укупно 29 прегледаних животиња није било потребно третирати против желудачно-цревних стронгилида у посматраном тренутку. Седам оваца (24,1%) је имало висок ниво инвазије и њима је третман против стронгилидозе у моменту испитивања био најпотребнији. Резултати паразитолошког прегледа у односу на ниво инвазије су приказани у табели 17.

Табела 17. Резултати паразитолошког прегледа у октобру 2015. године у односу на ниво инвазије и потреба за дехелминтизацијом.

Ниво	Критеријум (број јаја по граму)	Број оваца (%)	Налаз броја	Потреба за
------	---------------------------------	----------------	-------------	------------

инвазије			јаја (мин-мах)	дехелминтизацијом
Низак	Мање од 500 јпг	16 (55,2)	0-450	Не
Умерен	500-1500 јпг	6 (20,7)	925-1325	Да
Висок	Преко 1500 јпг	7 (24,1)	1850-7800	Да

Од 15 прегледаних узорака оваца третираних ивермектином, 6 животиња је имало мање од 150 јпг што није довољно јаја за FECR тест, тако да је само 9 оваца укључено у израчунавање ефикасности ивермектина у октобру 2015. године.

Табела 18. Вредности јпг стронгилида током трајања испитивања ефикасности ивермектина у октобру 2015. године. (Приказани се налази свих 15 прегледаних оваца. Подебљани бројеви 0. дана илуструју 9 оваца са довољним бројем јаја за FECRT. Црвени бројеви у табели представљају налаз броја јаја код 9 оваца 14. дана након лечења. Три подвучена броја означавају налаз преко 500 јпг што значи да те овце и даље имају умерен ниво инвазије и да им је потребна дехелминтизација ефикасним антихелминтиком)

Р.бр.	Огледна група – налаз броја јаја стронгилида (јпг)	
	0.дан	14. дан
1	100	Није узорковано!Недовољно за FECRT.
2	1150	75
3	1850	<u>525</u>
4	1100	<u>1025</u>
5	200	25
6	0	Није узорковано!Недовољно за FECRT.
7	1850	<u>875</u>
8	100	Није узорковано!Недовољно за FECRT.
9	7800	200
10	1150	250
11	100	Није узорковано!Недовољно за FECRT.
12	1125	175
13	75	Није узорковано!Недовољно за FECRT.
14	450	125
15	0	Није узорковано!Недовољно за FECRT.

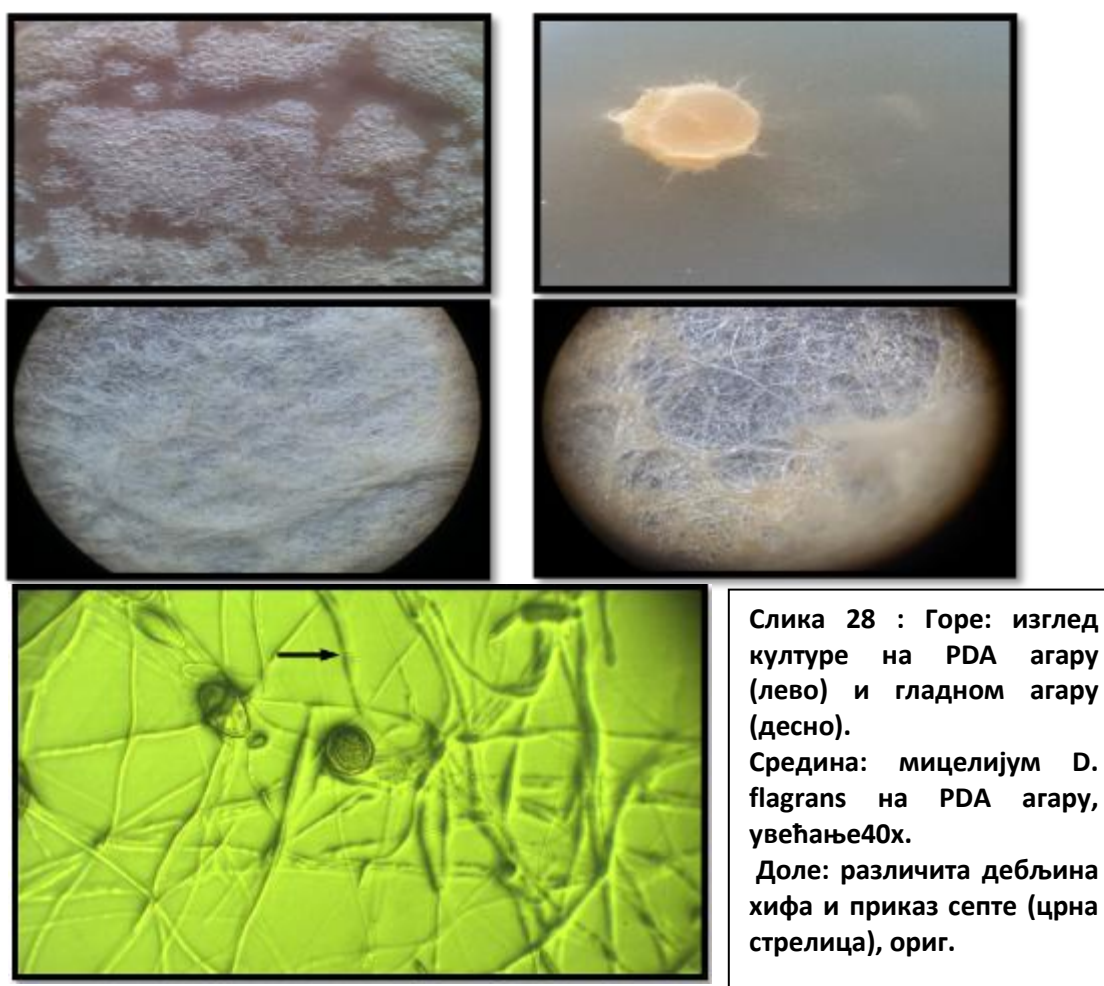
Резултати FECR теста су показали да је ефикасност ивермектина против стронгилида била 80% (95% ИП: 40-94). Од 9 оваца које су биле укључене у FECR тест, све су избацивале јаја 14 дана након третмана ивермектином у распону од 25-1025 јпг. Три овце су и након третмана ивермектином имале умерен ниво инвазије са бројем јаја између 500 и 1500 јпг, што значи да им је и даље била потребна терапија довољно ефикасним антихелминтиком. На основу броја јаја на дан третмана „на слепо“, 8 оваца (53,3%) није требало уопште дехелминтисати у датом моменту, јер нису имале више од 500 јпг. Резултати паразитолошког прегледа приказани у табели 18.

Инфективне ларвице идентификоване након третмана припададе су родовима *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* и *Haemonchus*.

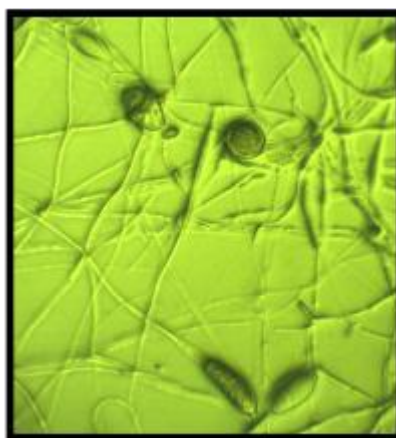
1.1. Карактеристике нематофагне гљиве *Duddingtonia flagrans* MUCL 9827

5.5.1. Морфологија различитих структура гљиве

Култивацијом изолата *D. flagrans* MUCL 9827 на хранљивим подлогама расту **колоније** беле до светло смеђе боје, густо покривајући подлогу (на PDA агару) или је раст проређен (на гладном агару) (слика 28). **Мицелијум** је сачињен од мноштва хијалиних **хифа**, које су праве, септиране, и гранају се под различитим угловима. „Главне“ хифе могу бити различите дебљине, у просеку $3,97 \pm 0,78 \mu\text{m}$ (распон од 3,12-5,75 μm). Постоје врло танке хифе просечног промера $2,53 \pm 0,32 \mu\text{m}$ (распон од 1,78-2,98 μm) на појединим деловима подлоге, а уочен је и необичан раст мицелијума у форми „дебљих грана“ које чини мноштво хифа које се простиру у истом правцу и делују спојено. Оне се даље гранају бочно, и мицелијум наставља раст на подлози. Овакав раст је уочен на гладном агару.



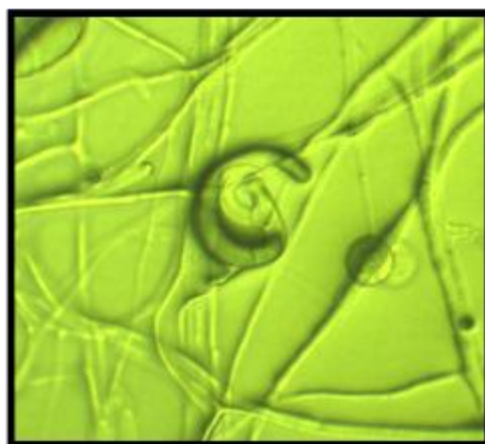
На мицелијуму се развијају интеркаларне **хламидоспоре**. Потпуно зреле хламидоспоре су углавном округластог или сферичног облика, имају дебели зид и гранулирану, неравну површину. Током сазревања се могу запазити различити облици хламидоспора- округласти, елипсоидални, крушкасти или неправилни, што је условљено степеном зрелости (слика 29). Просечна дужина измерених хламидоспора, укључујући облике од округлих до елипсоидалних, ($n=69$) је $33,16 \pm 8,87 \mu\text{m}$ (распон 13,37-52,49 μm).



Слика 29: Изглед хламидоспора на PDA агару (лево) и гладном агару (десно), увећање 250х, ориг.

Приликом прегледа подлога (гладни агар) у које су додате инфективне ларвице желудачно-цревних стронгида оваца, пронађене су и фотографисане две **конидије** изолата *D. flagrans* MUCL 9827 различите зрелости (слика 30); једна развијена и једна у стадијуму развоја. Развијена конидија је овоидног облика, дужине 33,21 μm и ширине (на најширем делу) 8,11 μm . Подељена је на два места трансверзалним септама на три ћелије подједнаке величине. Конидије су израсле на врху еректилне, септиране **конидиофоре**, дужине око 160 μm . Прегледом неколико култура, није пронађено више конидија, осим описаних.

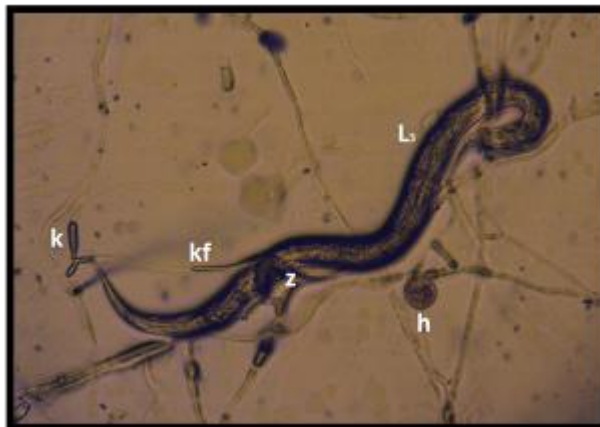
Стимулисана додавањем инфективних ларвица нематода, *D. flagrans* MUCL 9827 на гладном агару развија тродимензионалне адхезивне мреже – **замке** (слика 31), које су настале на појединим местима од хифа гранањем, увртањем и прављењем анастомоза. Замке су имале једну до три петље помоћу којих хватају ларвице. Екстерни дијаметар једне измерене петље је 54,79x46,23 а интерни 34,83 x 29,64 μm .



Слика 30 (лево). Изглед конидије на гладном агару, ориг. Слика 31 (десно). Изглед замке на гладном агару, ориг. Увећање 250х.

Различите морфолошке структуре изолата *D. flagrans* MUCL 9827 су приказане на слици 32.

Слика 32. Приказ хламидоспоре (х), конидија (к), конидиофоре (кф), замке (з). Увећање 250х, ориг.



5.5.2. Раст на хранљивим подлогама

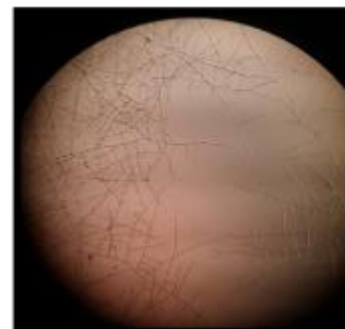
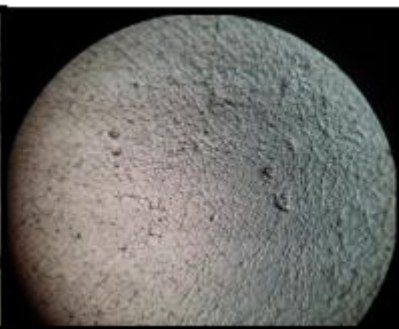
5.5.2.1. Раст на кромпировом агару

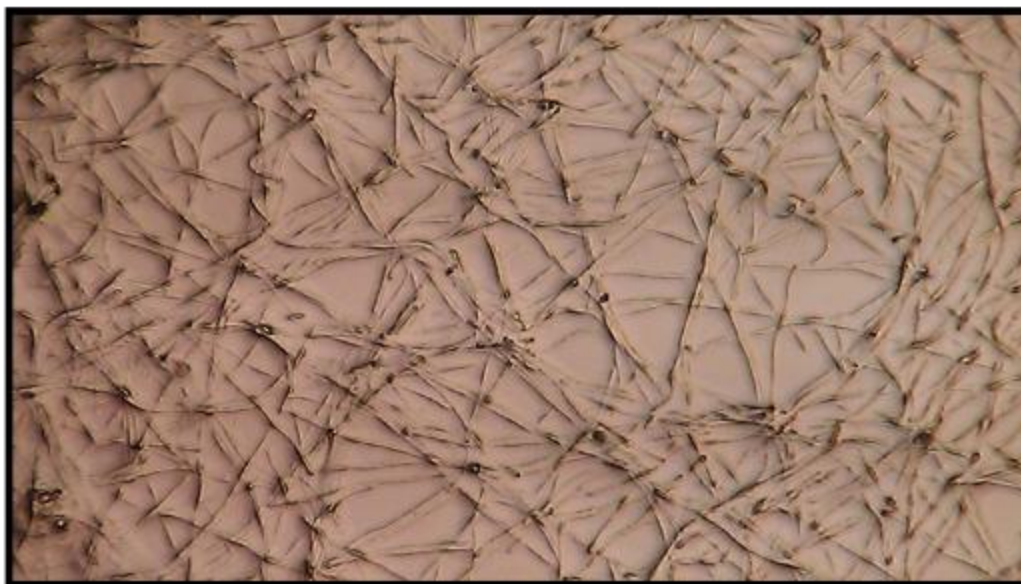
Изолат *D. flagrans* MUCL 9278 веома добро расте на PDA агару на задатој температури од 25°C. Споре клијају у првих 24 сата након засејавања, и уочава се брз раст хифа (слика 33). Значајно формирање мицелијума је забележено након 48 сати од засејавања. На појединим деловима Петри кутије се могу пронаћи поља густо формираног мицелијума а постоје и „зоне раста“ где још увек подлога није прекривена хифама. Формирање хламидоспора на мицелијуму почиње након 48 сати- могу се уочити многобројна задебљања на хифама од којих ће оне настати. Раст гљиве након 48 сати приказан је на сликама 34 и 35.



Слика 33 (лево). Раст гљиве на PDA након 24 сата- клијања спора и почетак раста хифа, ориг.

Слика 34 (доле). Раст гљиве на PDA након 48 сати- прерастање мицелијума преко кутије са пољима густог мицелијума и зонама раста, ориг.



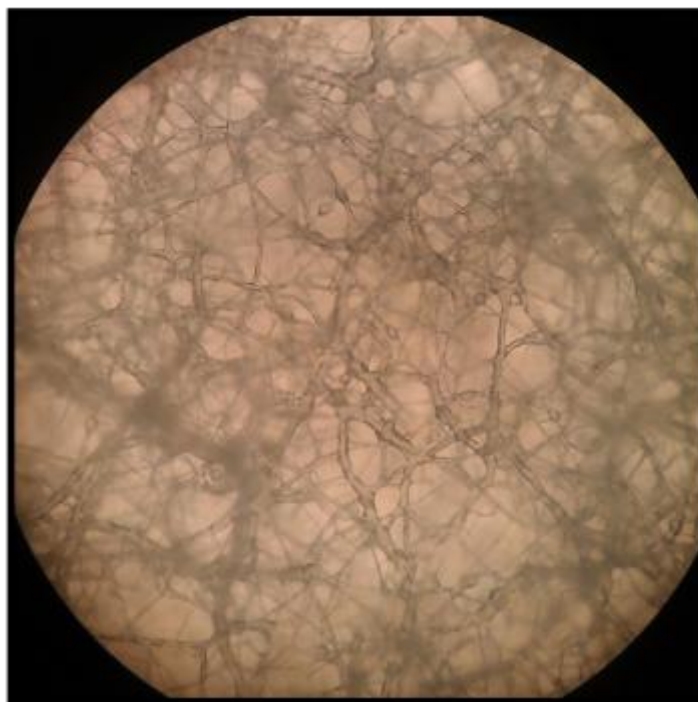


Слика 35. Почетак процеса формирања хламидоспора на мицелијуму 48 х након засејавања, ориг.

Пет дана након засејавања, изолат прераста целу површину Петри кутије и култура добија на запремини (удебљава се) због добре разгранатости што је последица раста мицелијума који сада има тродимензионалну структуру. Процес формирања хламидоспора се наставља, и оне се формирају на деловима новоствореног мицелијума (слика 36).



Слика 36. Изглед културе гљиве након 5 дана (горе). Разграната тродимензионална мрежа мицелијума са новоформираним хламидоспорама (десно), ориг.



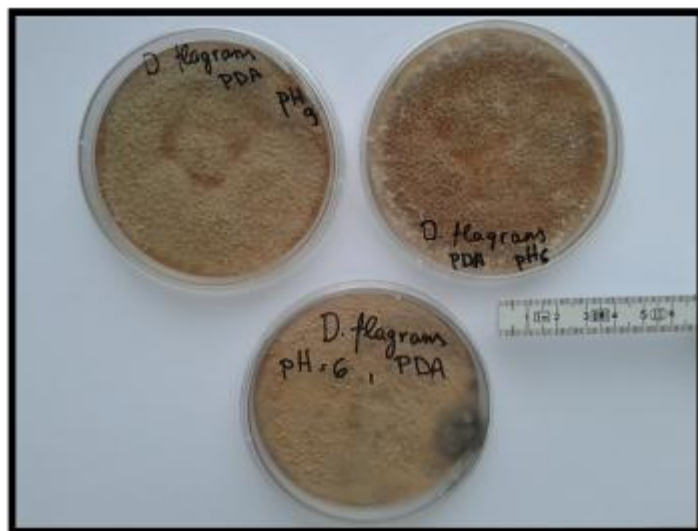
Након седам дана раста на кромпировом агару нема значајнијег увећања површине и дебљине мицелијума, нити значајног повећања у броју новоформираних хламидоспора, иако је евидентно да је у току процес њиховог сазревања.

Површина и дебљина мицелијума се не мења ни једанаест дана од почетка култивације, али је зато знатно повећана количина хламидоспора различитог облика, условљеног стадијумом зрелости, које се у изобиљу могу видети на сваком делу мицелијума. Нема промене у расту мицелијума ни шеснаест дана од почетка култивације на задатој температури, и мада је тешко направити јасну разлику, забележено је да је бројност хламидоспора слична као и у претходном посматрању, уз напомену да је степен зрелости сразмеран протеклом времену (слика 37).



Слика 37. Изглед културе гљиве након 16 дана (лево). Изобиље хламидоспора различите зрелости на мицелијуму старом 11 дана (средина) и 16 дана (десно), ориг.

Изолат *D. flagrans* MUCL 9278 подједнако добро расте на PDA агару који има pH вредност 6 или 9, уз напомену да је на pH=9 ређи налаз контаминираних култура гљиве (слика 38).



Слика 38 Изглед културе *D. flagrans* MUCL 9278 на PDA агару различите pH вредности. Контаминација је присутна у Петри кутији где је pH=6, ориг.

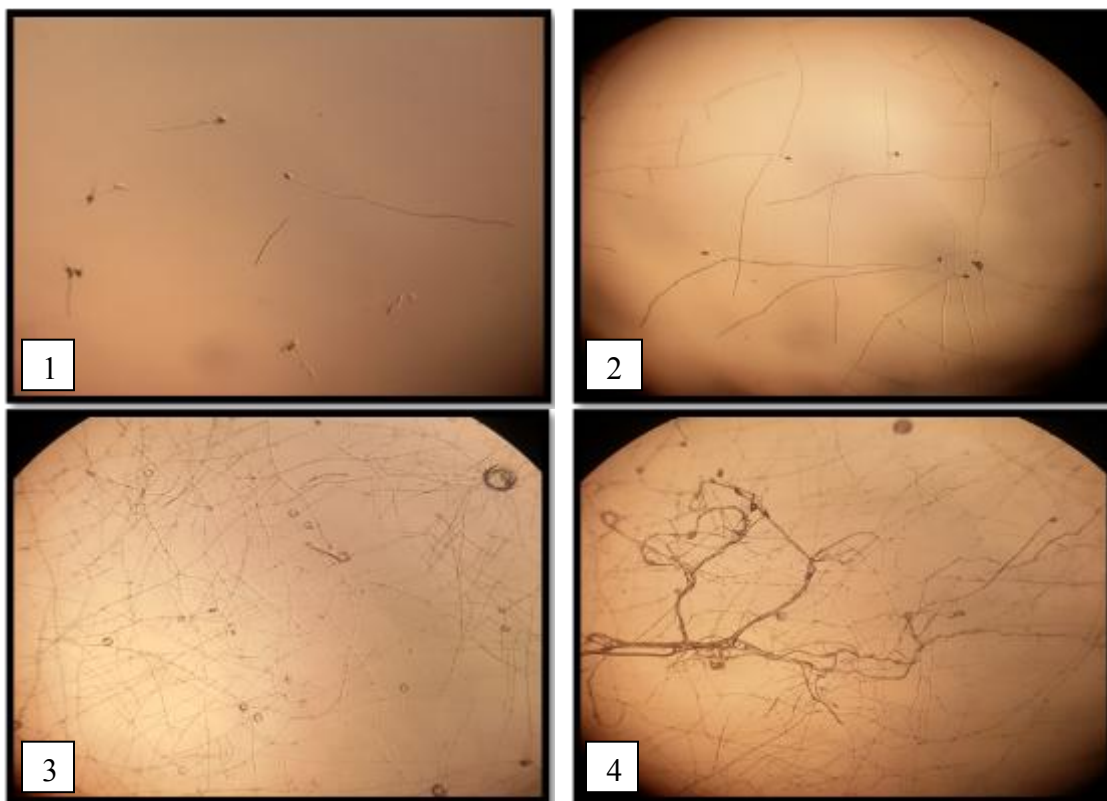
5.5.5.2. Раст на гладном агару

Изолат *D. flagrans* MUCL 9278 засејан на гладном агару расте споро на температури од 25°C. Изолат успева временом да прерасте површину подлоге, али је не покрива густом мрежом мицелијума, већ је раст проређен. Детаљан опис раста на гладном агару након засејавања 500 хламидоспора или убацивања дискова агара са седмодневном културом гљиве је приказан.

а) Раст након додавања 500 хламидоспора:

Двадесетчетири сата након засејавања спора, део спора клија и хифе полако почињу да расту, а део спора још није исклијао. Слична ситуација је забележена и након 48 сати од засејавања, где део спора још није исклијао. Три дана након засејавања, нема значајног повећања под мицелијумом. Део спора није клијао, неке тек сада клијају, а из других увелико расту хифе полако се гранајући и правећи мицелијум. Пет дана од засејавања, мицелијум прекрива значајан део подлоге, али није прерастао целу Петри кутију. После шестог и седмог дана култура је прерасла скоро целу малу Петри кутију у танком слоју слабо испреплетаног мицелијума, уз постојање места са ређим мицелијумом где је раст био успорен или места где га уопште није ни било.

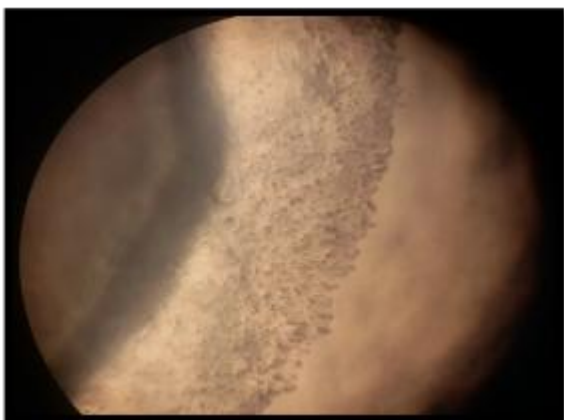
Слика 39 (следећа страна). Клијање и спора и раст хифа након 24 сата (1) и 72 сата (2) од засејавања. Налаз великог броја петљи (3) и дебелих грана хифа (4) на култури, ориг.



Хифе су почеле да се увијају и праве анастомозе и мрежу. Где је мрежа хифа гушћа, ту је увијање интензивније тако да се формирају структуре попут омче или петље различите величине и промера које подсећају на замке. Након десет дана, култура је прерасла Петри кутију, почело је формирање хламидоспора на појединим хифама. На појединим деловима мицелијум дебља и формирају се „дебеле гране“ мицелијума које се састоје од спојених хифа које расту у истом правцу.

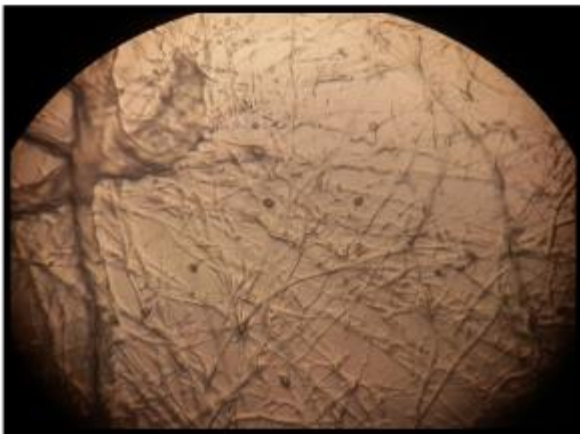
б) након убацивања дискова агара са седмодневном културом гљиве:

У прва три дана након убацивања дискова са седмодневном културом, запажен је раст мицелијума од око 2 милиметра дневно, да би пет дана од засејавања, мицелијум је порастао на 1 цм од ивице диска. Прерастање мицелијума преко целе подлоге није забележено ни након 7 дана култивације, али је зато развој мицелијума до самог диска веома добар, где је формирана тродимензионална мрежа. Постоје и завоји мицелијума који подсећају на замке. Такође, уочен је почетак формирања хламидоспора. Раст је ограничен на 12-13 мм од ивице диска. Десет дана након засејавања је раст мицелијума достигао 17-18 мм од ивице диска. Још увек на оптималној температури раста није изолат прерастао целу површину Петри кутије.



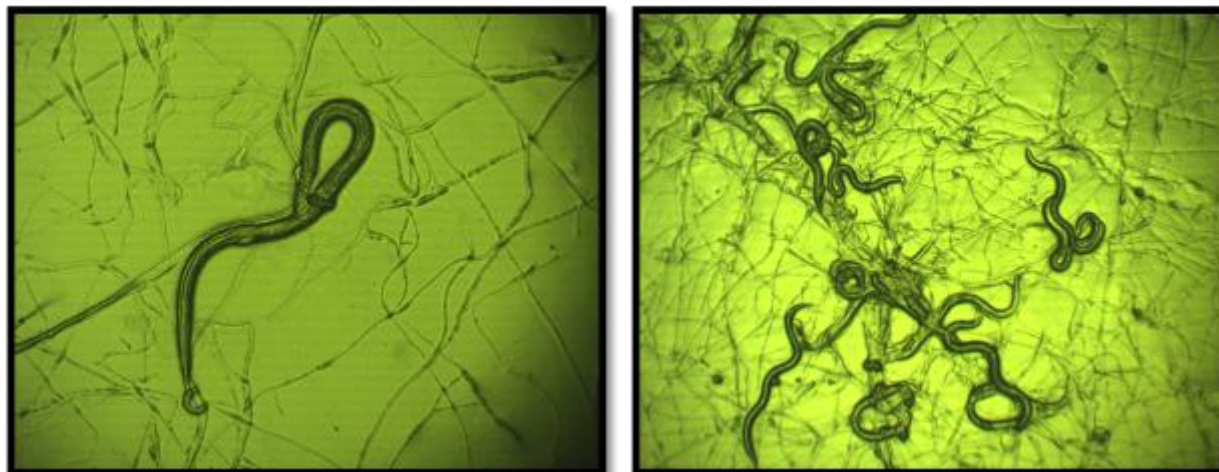
Слика 40 (лево): Раст гљиве 2 мм од диска након 24 сата инкубације, ориг.

Слика 41 (доле): Раст изолата гљиве на гладном агару након 7 дана (лево) и изглед мицелијума са завојима који подсећају на петље (десно), ориг.

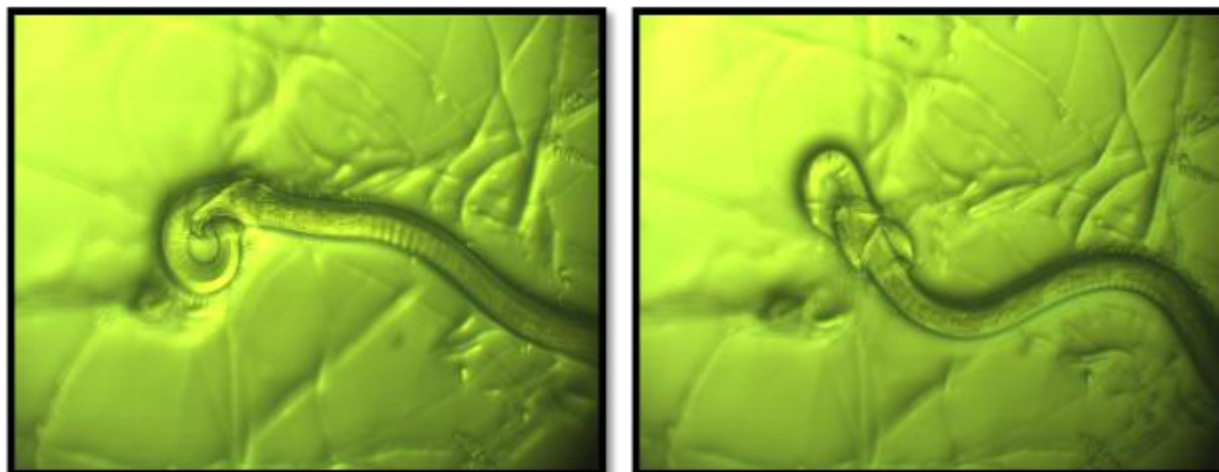


5.5.3. Нематофагна активност изолата *D. flagrans* MUCL 9827

Изолат *D. flagrans* MUCL 9827 је испољио нематофагну активност хватањем инфективних ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца (слика 42 и слика 43), што је визуелизовано на гладном агару. Ларвице су ухваћене за различите делове укључујући предњи крај (главу), тело или реп, понекад и на више места истовремено.

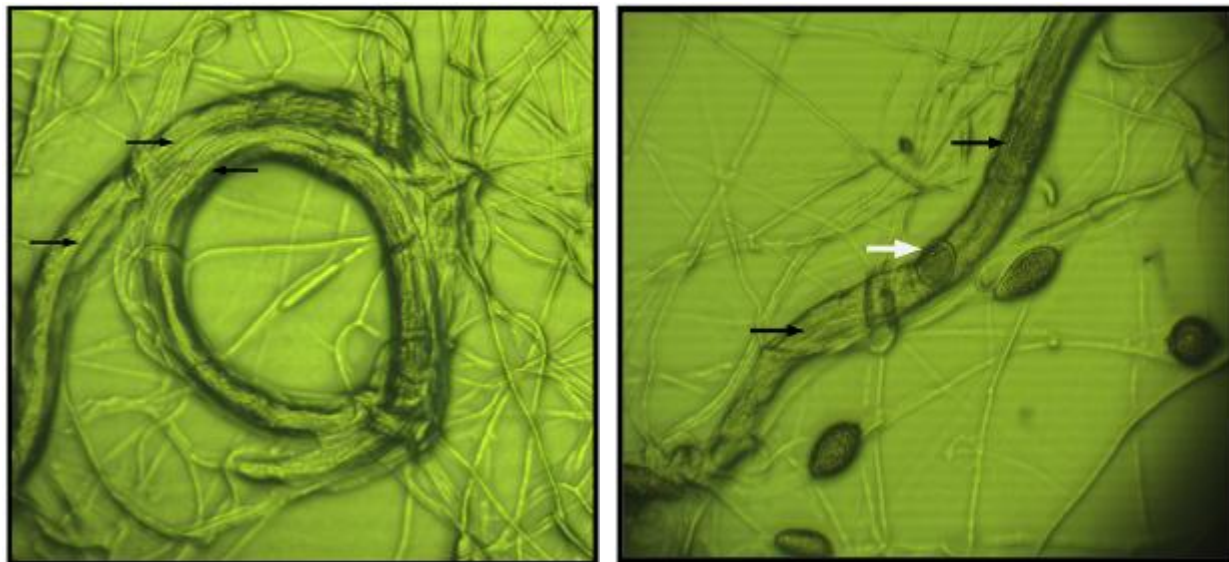


Слика 42. Ухваћена једна ЛЗ (лево, увећање 100х) и мноштво ЛЗ (десно, увећање 40х), ориг.



Слика 43. Инфективна ларвица ухваћена у пределу главе (лево) и у пределу једњака (десно). Увећања 250х, ориг.

Такође, уочен је доказ коришћења ухваћене ларвице у обезбеђивању хранљивих материја за колонију *D. flagrans* проналажењем трофичних хифа и развијене хламидоспоре унутар њеног тела (слика 44).

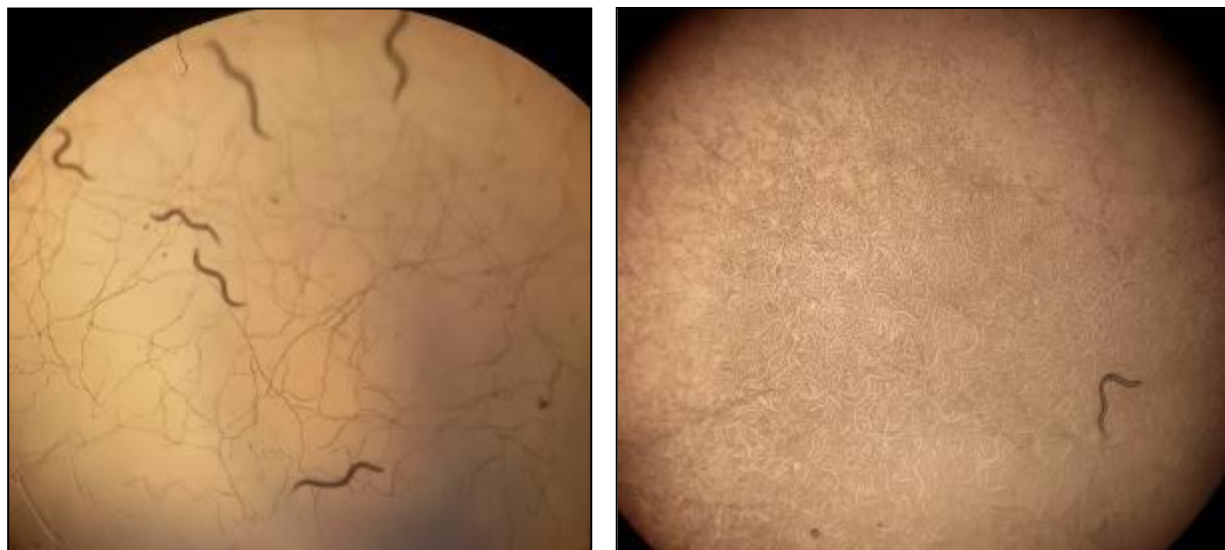


Слике 44. Лево и десно: трофичне хифе унутар тела ухваћених ларвица које су почеле да се распадају (црне стрелице). На слици десно се види хламидоспора унутар тела ларвице (бела стрелица). Увећања 250х, ориг.

5.6. Испитивање *in vitro* ефекта изолата *D. flagrans* MUCCL 9278 на желудачно-цревне стронгилиде оваца

5.6.1. *In vitro* утицај нематофагне активности изолата нематофагне гљиве *Duddingtonia flagrans* MUCCL 9827 на ларвице желудачно-цревних стронгилида оваца

Покретљивост инфективних ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца је током трајања огледа била уједначена у свим културама, са подједнаким бројем веома активних (углавном доминантне), увијених и мртвих ларвица. Двадесет четири сата након додавања у Петри кутије, ларвице су биле веома активне и покретне (осим родова *Oesophagostomum*/*Chabertia* које су се показале као слабо покретне на гладном агару). Мањи број ларвица је био још увек увијен и непокретан, али нису угинуле. Било је и неколико (врло мало) мртвих ларвица у свим културама. После трећег дана, број активних ларвица се смањује, али до петог дана још увек постоји већи број веома активних ЛЗ које се провлаче кроз мицелијум. Да би се до краја огледа осигурало присуство довољног броја веома активних ЛЗ у циљу додатне стимулације нематофагне активности, петог дана је додата нова количина од 500 свежих ЛЗ. Покретљивост и број активних ЛЗ које су се кретале по читавој површини сваке културе је био задовољавајући до последње провере нематофагне активности.



Слика 45. Кретање ларвица по површини агара са културом *D. flagrans* MUCL 9827, ориг. Лево је приказано мноштво активних ЛЗ како се крећу преко мицелијума, а десно „трагови мигрирајућих ларвица“ међу спорама *Rhizopus*-а у контаминираној култури (због отварања поклопца) – доказ да активне ЛЗ прођу сваки делићем подлоге што је предуслов за хватање у замке.

Раст и динамика развоја мицелијума и осталих структура гљиве у културама се доста разликује током трајања огледа, што је и очекивано с обзиром на различите методе засејавања. При првој провери раста гљиве 24 сата од почетка огледа, у две серије култура (500 и 1000 засејаних хламидоспора) које су расле 7 дана на оптималној температури пре мешања са суспензијом ЛЗ, мицелијум је релативно добро порастао прекривајући скоро целу површину подлоге. Током трајања огледа није било значајног повећања раста и промена у површини подлоге прекривене мицелијумом. С друге стране, никакав, односно, слаб и веома спор раст је забележен у културама где су хламидоспоре гљиве одмах помешане са ларвицама и у културама са дисковима. Два дана од истовремене инокулације хламидоспора и ЛЗ није забележено клијање спора па није било никаквог раста гљиве. Тренд лошег клијања и слабог раста се одржава током неколико наредних дана, па су те културе последњи пут прегледане петог дана. У серији Петри кутија са дисковима, раст мицелијума од ивице диска се прогресивно повећава током трајања огледа, али је толико спор, да култура ни 10 дана након засејавања не успева да прерасте целу подлогу и не стиже до ивице Петри кутије.

Нематофагна активност изолата *D. flagrans* MUCL 9827 је током трајања *in vitro* огледа на гладном агару била веома слаба. У већини Петри кутија прегледаних 24 сата након додавања инфективних ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца није забележена никаква нематофагна активност. То и није неочекивано у две серије (хламидоспоре одмах помешане са ЛЗ и дискови) с обзиром на динамику раста и развоја гљиве. Међутим, у скоро свим Петри кутијама оних серија где је било релативно доброг раста мицелијума (седмодневне културе са 500 и 1000 засејаних хламидоспора) такође није било нематофагне активности. Добра нематофагна активност

је забележена само у једној Петри кутији (од 3 понављања) засејаној са 1000 хламидоспора, где је већ након 24 сата од додавања ухваћена велика већина активних ЛЗ. Даљих промена у нематофагној активности током огледа није било, и хватање ЛЗ је забележено само у тој једној кутији.

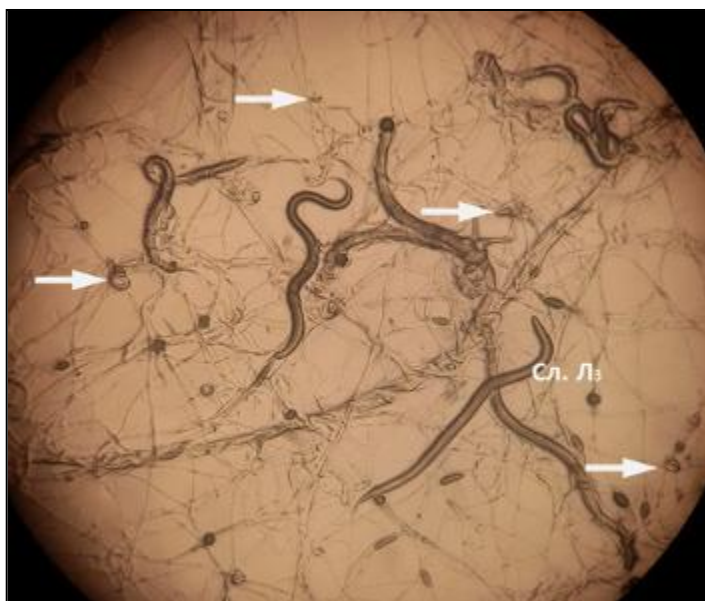
Динамика развоја замки за хватање ларвица нематода у културама је разлог за одсуство нематофагне активности. Током трајања огледа, у прегледаним културама *D. flagrans* MUCL 9827 нигде није било развоја замки, осим у поменутој Петри кутији. У другим кутијама је било развоја раније поменутих петљи мицелијума, које су у почетку рада са гљивом сматране замкама. Међутим, посматрањем кретања ларвица на подлогама, уочено је да се оне провлаче кроз мицелијум и те петље не остајући заробљене у највећем броју случајева. Спорадично је пронађено мање ларвица које су биле запетљане у мицелијум, углавном у региону репа, али није било јасне нематофагне активности која је условљена појавом лепљивих тродимензионалних замки, које нису пронађене у тим културама упркос присуству великог броја активних ЛЗ.



Слика 46. Нејасна нематофагна активност, ориг.

Ларвица стронгилида је ухваћена у региону репа, али нема видљивих замки у култури гљиве.

Тродимензионалне замке су се развиле само у једној (поменутој) Петри кутији већ 24 сата након додавања ЛЗ, с тим што нису биле дифузно распоређене него груписане у три „зоне развоја“ на површини подлоге. Локализација и број развијених замки остаје непромењен до краја огледа, тако да је нематофагна активност била ограничена само на „зоне хватања ларвица“. Такође, уочено је да је хватање било најинтензивније након 24 сата када је ухваћено највише ЛЗ, а да стагнира током наредног периода када је на дневном нивоу спорадично хватано по неколико нових ЛЗ. Све време је било и слободних активних ЛЗ које су се кретале по подлози повремено пролазећи кроз „зоне развоја замки“, али то није условило формирање нових замки и нематофагну активност већег обима. Седмог дана је уочена стагнација у хватању, а десетог дана и неке ларвице које су се након хватања ослободиле и на себи носиле откинуте замке.



Слика 47. Пролазак слободне ларвице (Сл. Л3) кроз „зону развоја“ замки, ориг.
На слици се такође виде бројне ухваћене Л3 од којих се неке већ распадају, а још увек има доста слободних замки (беле стрелице).

Због веома слабе нематофагне активности у овом огледу, није било енумерације ларвица и утврђивања процента њихове редукције помоћу формула за рачунање ефикасности *D. flagrans* у хватању Л3. Детаљан опис активности инфективних ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца у културама, хронологија раста изолата *D. flagrans* MUCCL 9827 засејаног на различите начине и нематофагне активности током трајања огледа је приказани су у Табели 19.

Табела 19. Детаљи in vitro провере нематофагне активности *D. flagrans* MUCCL 9827 против ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца на 2 % гладном агару.

Дозе <i>D. flagrans</i> MUCCL 9827 и опис активности ларвица и гљиве на посматраним културама					
Време прегледа	Контрола (само ларвице)	500 спора <i>D.f.</i> + ларвице	Дискови (стари 7 дана)+ ларвице	500 спора <i>D.f.</i> (старе 7 дана) + ларвице	1000 спора <i>D.f.</i> (старе 7 дана) + ларвице
24 сата	Велика већина Л3 се веома активно креће, мањи број је увијен или непокретан (угинуле).	Активност Л3 као у контролним Петри кутијама. Хламидоспоре гљиве не клијају, груписане су покретима Л3. Нема нематофагне активности.	Активност Л3 као у контролним Петри кутијама. Започео раст мицелијума, само пар мм од ивице диска. Нема нематофагне активности.	Активност Л3 као у контролним Петри кутијама. Култура прерасла скоро целу кутију, уз постојање празних површина. Иако се Л3 активно провлаче кроз мицелијум, нема развоја замки. Нема нематофагне активности.	Активност Л3 као у контролним Петри кутијама. Култура прерасла скоро целу кутију, уз постојање празних површина. Иако се Л3 активно провлаче кроз мицелијум, нема развоја замки нити нематофагне активности у две Петри кутије. У трећој кутији забележена НЕМАТОФАГНА АКТИВНОСТ , са великим бројем ухваћених Л3.
48 сати	Велика већина Л3	Активност Л3 као у	Активност Л3 као у	Активност Л3 као у контролним Петри	Активност Л3 као у контролним Петри

Дозе <i>D. fragrans</i> MUCL 9827 и опис активности ларвица и гљиве на посматраним културама					
Време прегледа	Контрола (само ларвице)	500 спора <i>D.f.</i> + ларвице	Дискови (стари 7 дана)+ ларвице	500 спора <i>D.f.</i> (старе 7 дана) + ларвице	1000 спора <i>D.f.</i> (старе 7 дана) + ларвице
	се веома активно креће, мањи број је увијен или непокретан (угинуле).	контролним Петри кутијама.	контролним Петри кутијама.	кутијама.	кутијама.
		Хламидоспоре гљиве не клијају, груписане су покретима Л ₃ .	Мицелијум порастао око 5 мм од ивице диска.	Раст мицелијума непромењен у односу на претходно посматрање културе.	Раст мицелијума непромењен у односу на претходно посматрање културе.
		Нема нематофагне активности.	Л ₃ се провлаче кроз израсли мицелијум, али нема развоја замки нити нематофагне активности.	Иако се Л ₃ активно провлаче кроз мицелијум, нема развоја замки. Нема нематофагне активности.	Иако се Л ₃ активно провлаче кроз мицелијум, нема развоја замки нити нематофагне активности у две Петри кутије. У трећој кутији има ново-ухваћених Л ₃ , а старе су почеле да се распадају. Слободне Л ₃ се активно крећу. Замке нису формиране дифузно, него су груписане у „зонама“.
72 сата	Већина Л ₃ се активно креће, део је увијен или непокретан (угинуле).	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама.	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама.	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама.	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама.
		Хламидоспоре или уопште не клијају, или је то веома слабо.	Мицелијум расте између 5 и 10 мм од ивице диска.	Раст мицелијума непромењен у односу на претходно посматрање културе.	Раст мицелијума непромењен у односу на претходно посматрање културе.
		Нема нематофагне активности.	Л ₃ се провлаче кроз израсли мицелијум, али нема развоја замки нити нематофагне активности.	Иако се Л ₃ активно провлаче кроз мицелијум, нема развоја замки. Нема нематофагне активности.	Иако се Л ₃ активно провлаче кроз мицелијум, нема развоја замки нити нематофагне активности у две Петри кутије. У трећој кутији има ново-ухваћених Л ₃ , а старе се распадају. Слободне Л ₃ се активно крећу. Развој замки остао по „зонама“ – нема хватања по целој плочи.
5. дан	Већина Л ₃ је активна, део увијен и не креће се.	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама.	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама.	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама.	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама.
	Додато још 500 свежих Л ₃ .	Хламидоспоре или уопште не клијају, или је то веома слабо.	Мицелијум порастао 10ак мм од ивице диска.	Раст мицелијума непромењен у односу на претходно посматрање културе.	Раст мицелијума непромењен у односу на претходно посматрање културе.
		Нема нематофагне активности.	Иако се Л ₃ активно провлаче кроз мицелијум, нема развоја замки.	Иако се Л ₃ активно провлаче кроз мицелијум, нема развоја замки. Нема нематофагне активности.	Иако се Л ₃ активно провлаче кроз мицелијум, нема развоја замки нити нематофагне активности у две Петри кутије. У трећој кутији има ново-

Дозе <i>D. flagrans</i> MUCL 9827 и опис активности ларвица и гљиве на посматраним културама					
Време прегледа	Контрола (само ларвице)	500 спора <i>D.f.</i> + ларвице	Дискови (стари 7 дана)+ ларвице	500 спора <i>D.f.</i> (старе 7 дана) + ларвице	1000 спора <i>D.f.</i> (старе 7 дана) + ларвице
		Последње посматрање ове серије.	Нема нематофагне активности. Додато још 500 свежих ЛЗ.	Додато још 500 свежих ЛЗ.	ухваћених ЛЗ, а старе се распадају. Још увек има слободних ЛЗ. Додато још 500 свежих ЛЗ.
7. дан	Већина ЛЗ је активна, део увијен и не креће се, има и угинулих.	/	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама. Мицелијум порастао 15ак мм од ивице диска. Доста ЛЗ се завлачи испод диска. ЛЗ се активно провлаче кроз мицелијум. У две кутије се по једна ЛЗ запетљала у мицелијум у региону репа, али нема развоја замки. Нема јасне нематофагне активности.	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама. Раст мицелијума непромењен у односу на претходно посматрање културе. Постоји контаминација једне културе (споре <i>Rhizopus-a</i>) због гледања отворених Петри кутија. Иако се ЛЗ активно провлаче кроз мицелијум, нема развоја замки. Фотографисани „трагови мигрирајућих ларвица“ међу спорама <i>Rhizopus-a</i> , где се види да ЛЗ временом прођу сваким делићем подлоге. Нема нематофагне активности.	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама. Раст мицелијума непромењен у односу на претходно посматрање културе. ЛЗ се активно провлаче кроз мицелијум. У две кутије се неколико ЛЗ запетљало у мицелијум у региону репа, али нема развоја замки ни јасне нематофагне активности. У трећој кутији има можда пар ново-ухваћених ЛЗ. Нема нових површина где се развијају замке, ни после 7 дана. Још увек има слободних ЛЗ које не бивају ухваћене проласком кроз „зоне хватања“.
10. дан	Има довољно активних ЛЗ, јер је део додат 5. дана. Неке од раније додатих ЛЗ су мртве (провидне).	/	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама. Мицелијум порастао 20ак мм од ивице диска. Не прераста целу подлогу и не достиже ивице Петри кутије. Хватање ЛЗ и развој замки је исти као у претходном посматрању	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама. Раст мицелијума непромењен у односу на претходно посматрање културе. Хватање ЛЗ и развој замки је исти као у претходном посматрању културе. Нема нематофагне активности.	Активност Л ₃ као у контролним Петри кутијама. Раст мицелијума непромењен у односу на претходно посматрање културе. У две Петри кутије је хватање ЛЗ и развој замки исто као у претходном посматрању културе. Нема нематофагне активности. У трећој кутији има неколико ново-ухваћених ЛЗ, али само у „зонама хватања“. Нема

Дозе <i>D. flagrans</i> MUCL 9827 и опис активности ларвица и гљиве на посматраним културама					
Време прегледа	Контрола (само ларвице)	500 спора <i>D.f.</i> + ларвице	Дискови (стари 7 дана)+ ларвице	500 спора <i>D.f.</i> (старе 7 дана) + ларвице	1000 спора <i>D.f.</i> (старе 7 дана) + ларвице
			културе. Нема нематофагне активности.		новостворених „зона развоја замки“. Има много слободних и активних ЛЗ. Неке од њих су биле ухваћене и на себи носе откинуте замке.

5.6.2. Тест копрокултуре- ефекат *D. flagrans* посматран кроз однос ХПГ:ЈПГ

5.6.2.1 Налаз нематофагних гљива пре извођења огледа

Пре извођења теста копрокултуре у узорцима измета оваца није пронађен локални изолат *D. flagrans* нити је доказано присуство других нематофагних гљива.

У неколико узорака су пронађене гљиве које припадају роду *Pilobolus* (слика 48) и уобичајен су налаз на површини измета преживара (Taylor et al, 2007). Гљиве из овог рода немају значаја у нематофагној активности.



Слика 48.
Налаз
гљиве из
рода
Pilobolus,
ориг.

5.6.2.2. Дозно зависни ефекат гљиве на редукцију броја ларвица *in vitro*

У тесту копрокултуре је учествовало 11 оваца (експерименталних јединица) где је 8 животиња имало изолате желудачно-цревних стронгилида осетљиве на ивермектин, а 3 резистентне изолате. Узорак број 12 је била овца која је крајем октобра 2015. третирана ивермектином и имала је резистентни изолат стронгилида са нивоом јаја од 175 јпг две недеље након третмана. При узорковању за тест копрокултуре три недеље касније, број јаја је износио само 38 јпг, па је ова животиња искључена из огледа због недовољног нивоа јаја од бар 50 јпг који је неопходан за валидацију резултата редукције (McKenna, 1996).

Просечан принос ларвица у контроли је био 21,4 %, са распоном од 8,82 до 39,04%. За већину од 11 посматраних узорака, принос ларвица у 3 понављања у оквиру сваке контролне групе на нивоу појединачног узорка је био уједначен. Међутим, за 3 узорка је утврђено да је постојала статистички значајна разлика између понављања, што је приказано у Табели 20. Варијација у приносима ларвица у наведена три узорка је условила њихово искључење из анализе

результата теста копрокултуре због могућих грешака у тумачењу утицаја различитих доза гљиве на редукцију ларвица *in vitro*. Анализа резултата теста копрокултуре урађена на 8 узорка је показала да је изолат *D. flagrans* MUCL 9827, примењен на начин описан у огледу, показао слабу, дозно зависну, нематофагну активност у *in vitro* условима редукујући у просеку број ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца у распону од 11 до 29%. Поређењем просечног приноса ларвица у свим огледним и контролној групи утврђено је да та редукција није била статистички значајна ($p=0,827$) (Табела 21). Значајна разлика у приносу ларвица у односу на контролну групу је забележена само у два појединачна узорка (уз. 1 и 9). У једном од њих је забележено значајно смањење приноса у огледним групама (уз. 1) што означава праву редукцију, а у другом повећање приноса ЛЗ у огледним групама (уз. 9) и ту није било редукције ни за једну од испитиваних доза гљиве. Поред овог, постоји још један узорак где није било никакве редукције ларвица (уз. 3), што чини укупно два узорка без икаквог одговора на додавање *D. flagrans*.

Табела 20. Варијације у приносу ларви у контролним групама свих узорка. Приказани су приноси ларвица за 3 понављања у свим узорцима, као и просечни принос на нивоу појединачног узорка и на нивоу целог теста копрокултуре. Израчуната р-вредност се односи на варијације унутар приноса 3 понављања једног узорка. Црвене, подебљане и подвучене р-вредности означавају статистички значајну разлику у приносу ларвица на нивоу појединачног узорка.

Број узорка	Принос ларви у К групама (%)			Просечан принос на нивоу узорка	р вредност
	Понављање 1 х	Понављање 2 х	Понављање 3 х		
1	17,14	12,09	11,65	13,63	0,493
2	24,60	23,40	27,00	25,00	0,808
3	14,10	4,95	7,42	8,82	0,060
4	<u>20,73</u>	<u>33,29</u>	<u>63,09</u>	<u>39,04</u>	0,001
5	<u>54,81</u>	<u>22,96</u>	<u>27,41</u>	<u>35,06</u>	0,001
6	<u>10,00</u>	<u>22,86</u>	<u>34,29</u>	<u>22,38</u>	0,001
7	32,61	25,27	39,31	32,40	0,105
8	17,14	11,43	16,19	14,92	0,438
9	21,77	15,65	15,10	17,51	0,373
10	11,86	18,14	15,39	15,13	0,494
11	8,09	13,24	13,24	11,52	0,436
Просечан принос на нивоу целог теста				21,40	-

Од укупно 8 испитаних узорка, најмање редукције на појединачном нивоу је било за однос хламидоспора и јаја 2:1, где у 5 случајева она изостала. За овим следи однос ХПГ:ЈПГ 5:1, и помало неочекивано, однос 20:1 са по 3 негативна случајева. Однос 10:1 је показао скоро 4 % мању просечну редукцију од односа 20:1, али је зато овде било и најмање случајева без редукције-свега 2 на појединачном нивоу. Највећа појединачна редукција ларвица је износила 66,4% и остварена је у ХПГ:ЈПГ односу 10:1 (уз. 1), а најмања је била 2,13% (ХПГ:ЈПГ однос 5:1, уз. 8). Детаљни резултати теста копрокултуре су приказани у Табели 21.

In vitro нематофагна активност изолата *D. flagrans* MUCL 9827 у односу на стронгилиде које су осетљиве или резистентне на ивермектин (ИВМ) такође није била статистички значајна у односу

на контролу иако је било редукције ларвица. С друге стране, било је значајне разлике у проценту редукције између појединих доза гљиве посматране на нивоу просечне вредности редукције целог теста копрокултуре (свих 8 узорака) као и на нивоу 5 узорака који су груписани као изолати стронгилида осетљивих на ИВМ.

Табела 21. Резултати теста копрокултуре. Приказано је 8 узорака са приносом ларвица (у %) за све културе и са процентом редукције за културе са гљивом. АР статус означава да ли су испитивани изолати стронгилида били осетљиви или резистентни на ивермектин. Узорци број 3 и 9 су подвучени и приказани црвеном бојом, јер у та два узорка није било никакве редукције ларвица за било коју дозу гљиве у односу на контролну групу. р-вредности су приказане на нивоу појединачних узорака и на нивоу целог теста. Црвеном бојом су означене оне р-вредности код којих се принос ларвица између појединих доза и контроле значајно разликује. Различита слова означавају статистички значајну разлику ($p \leq 0.05$) у односу на: контролу (А), дозу 20:1 (Б), 10:1 (В), 5:1 (Г) и 2:1 (Д).

Број узорка	Број јаја по граму измета (јпг)	АР статус	Дозе <i>D. flagrans</i> MUCL 9827										р вредност
			Контрола	20:1		10:1		5:1		2:1			
			Просечан принос ларви	Просечан принос ларви	% реду-кције	Просечан принос ларви	% реду-кције	Просечан принос ларви	% реду-кције	Просечан принос ларви	% реду-кције		
1	910	O	13,63 ^{Б,Б,Д}	4,62 ^{А,Г}	66,13	4,58 ^{А,Г}	66,40	10,22 ^{Б,Б}	25,00	6,84 ^А	49,80	0,001	
2	375	O	25,00	17,30 ^Д	30,80	24,30	2,80	27,89	0,00	30,40 ^Б	0,00	0,239	
<u>3</u>	<u>1213</u>	<u>O</u>	<u>8,82</u>	<u>11,90</u>	<u>0,00</u>	<u>10,69</u>	<u>0,00</u>	<u>9,12</u>	<u>0,00</u>	<u>13,03</u>	<u>0,00</u>	0,490	
7	463	P	32,40	25,85	20,22	30,74	5,11	22,32	31,11	39,33	0,00	0,504	
8	105	P	14,92	15,56	0,00	9,52	36,17	14,60	2,13	9,52	36,17	0,373	
<u>9</u>	<u>735</u>	<u>P</u>	<u>17,51^{Б,Г}</u>	<u>19,32^Б</u>	<u>0,00</u>	<u>28,98^{А,Б,Д}</u>	<u>0,00</u>	<u>26,12^А</u>	<u>0,00</u>	<u>19,68^Б</u>	<u>0,00</u>	0,039	
10	1020	O	15,13	6,54	56,80	8,69	42,55	6,05	60,04	14,44	4,54	0,432	
11	1088	O	11,52	4,81 ^Д	58,24	5,94 ^Д	48,40	8,43	26,60	14,40 ^{Б,Б}	0,00	0,095	
Просек	739	-	17,37	13,24	29,02	15,43	25,18	15,59	18,11	18,46	11,31	0,827	

При томе, најмања доза је редуковала значајно мање ларвица од две највеће дозе на нивоу целог теста копрокултуре, односно од све три дозе посматрајући само стронгилиде осетљиве на ИВМ. Односи 20:1 и 5:1 се значајно разликују само код ИВМ осетљивих стронгилида. Резултати показују да се током огледа на просечном нивоу не разликују две највеће (односи 20:1 и 10:1) и две средње дозе хламидоспора (односи 10:1 и 5:1). Редукција ларвица стронгилида за 3 узорка груписаних према резистентности на ивермектин није показала статистички значајну разлику између посматраних доза *D. flagrans*.

Узимајући у обзир укупан учинак различитих доза изолата *D. flagrans* MUCL 9827 поређењем процената редукције ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца *in vitro*, јасно је да је за бољу нематофагну активност потребна доза заснована на већем ХПГ:ЈПГ односу. Међутим, између највећих доза нема значајне разлике у редукцији ларвица стронгилида. Разлика у редукцији у корист највећег ХПГ:ЈПГ односа 20:1 је око 4% на нивоу целог теста копрокултуре, односно нешто више од 10% ако се посматра редукција само ИВМ осетљивих изолата. С друге стране, ХПГ:ЈПГ однос 10:1 је показао за 7% већу просечну редукцију код ИВМ резистентних изолата стронгилида, што је свакако једна од најважнијих чињеница у примени нематофагних гљива у контроли желудачно-цревне стронгилидозе оваца. Осим тога, ова доза је имала и најмањи број негативних случајева редукције, што јој уз претходно изнете аргументе, додељује статус оптималне дозе изолата *D. flagrans* MUCL 9827 за *in vitro* редукцију ларвица стронгилида.

Сумирани резултати ефекта различитих доза гљиве на редукцију ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца су приказани у Табели 22.

Табела 22. Сумирани резултати учинка појединачних доза *D. flagrans* MUCL 9827 посматраних кроз однос ХПГ:ЈПГ. Приказане су вредности редукције за различите дозе гљиве у односу на цео тест копрокултуре и посебно за изолате стронгилида осетљиве или резистентне на ИВМ, као и број узорака без редукције. Црвеном бојом су означене оне р-вредности код којих се редукција ларвица између појединих доза значајно разликује. Различита слова означавају статистички значајну разлику ($p \leq 0.05$) у односу на: дозу 20:1 (А), 10:1 (Б), 5:1 (В) и 2:1 (Г).

Критеријум процене	n	Дозе <i>D. flagrans</i> MUCL 9827				p- вре- дност
		20:1	10:1	5:1	2:1	
Просечна редукција Л ₃ на нивоу целог теста (мин-мах)	8	29,02 ^Г (20,22-66,13)	25,18 ^Г (2,80-66,40)	18,11 (2,13-60,04)	11,31 ^{А,Б} (4,54-49,80)	0,009
Просечна редукција само за ИВМ осетљиве изолате (мин-мах)	5	42,39 ^{В,Г} (30,80-66,13)	32,03 ^Г (2,80-66,40)	22,33 ^{А,Г} (25,00-60,04)	10,87 ^{А,Б,В} (4,54-49,80)	0,001
Просечна редукција само за ИВМ резистентне изолате (мин-мах)	3	6,74 (20,22)	13,76 (5,11-36,17)	11,08 (2,13-31,11)	12,06 (36,17)	0,448
Број узорака без редукције (ИВМ: осетљ. + резистентни)	-	3 (1+2)	2 (1+1)	3 (2+1)	5 (3+2)	-

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Налази паразитолошких испитивања оваца

Помоћу метода флотације и копрокултуре, на основу морфологије и величине јаја и инфективних ларвица нематода је добијен увид у врсте паразита која инвадирају овце на посматраном имању. Налаз је касније потврђен *post mortem* прегледом органа и идентификацијом одраслих хелмината, и у складу је са резултатима копролошког прегледа. Након свеукупних паразитолошких испитивања, утврђено је да су овце на имању домаћини за једанаест врста желудачно-цревних нематода, а пронађене су и пантљичаре из рода *Moniezia*.

Од желудачно-цревних нематода су присутни:

- **у сиришту:** *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* и *Trichostrongylus axei*;
- **у танком цреву:** *Trichostrongylus colubriformis*, *Nematodirus spathiger*, *Nematodirus filicollis*, *Nematodirus abnormalis* и *Strongyloides papillosus*;
- **у дебелом цреву:** *Chabertia ovina*, *Oesophagostomum venulosum* и *Trichuris discolor*.

Важно је напоменути да су процене заступљености појединих родова/врста засноване на копролошким техникама, а не на прецизнијем *post mortem* прегледу органа и бројањем паразита, и да се односе пре свега на одрасле овце а не на јагњад. Применом копрокултуре у идентификацији може доћи до непрецизне процене заступљености појединих врста што је условљено различитом брзином развоја ларвица у вештачким условима инкубатора која је условљена различитим захтевима за оптималном температуром (O'Connor и сар, 2006). У случајевима када се узорак чува дуго на температури фрижидера пре постављања у инкубатор, то може смањити проценат успешно излежених јаја неких врста (*Haemonchus contortus*) што утиче на њихову бројност у култури и последично на интерпретацију резултата (McKenna, 1998). Даље, добро је познато да неке врсте попут *Teladorsagia circumcincta* полажу мање јаја у случајевима велике бројности паразита у дигестивном тракту (Coles и сар, 2006), што може такође потценити њихов прави број у животињама. Процена заступљености паразита из рода *Nematodirus* у одраслих оваца помоћу копролошких техника подлеже највећој непрецизности јер је познато да постоји старосна резистенција и да је овај паразит најзаступљенији код јагњади (Петровић и сар, 1960). Осим тога, доказано је да број јаја у граму измета није поуздан показатељ степена инвазије *Nematodirus*-ом (Петровић и сар, 1960), те да копролошки негативне животиње могу имати и до 11.000 паразита у цревима (Chalmers, 1985).

Од укупног броја прегледаних оваца, у 96% случајева су животиње биле заражене стронгилидама. Доминантна врста је *Haemonchus contortus*, за којом следи род *Trichostrongylus*, па *Oesophagostomum/Chabertia* док је најмање заступљена *Teladorsagia circumcincta*. Одрасле овце су биле мање инвадиране родом *Nematodirus*; свега око 35% узорака је било позитивно на јаја ових паразита. Током периода истраживања, установљено је да су *Strongyloides papillosus* и род *Trichuris* слабо заступљени код одраслих оваца, те да, за сада, представљају патогене од занемарљивог значаја. Познато је да је паразитски гастроентеритис ретко проузрокован само једном врстом паразита, тако да се болест може дефинисати према оној врсти која преовлађује на неком подручју (Катић и сар, 1967). Може се рећи да код оваца на испитиваном имању доминира хемонхоза током свих годишњих доба. У зимском периоду је присутна у високом проценту, али

налаз треба узети са резервом због једне прегледане копрокултуре. У пролеће је такође веома заступљена (у просеку са 70%), највиши ниво достиже у летњим месецима, док се у јесен смањује. Хемонхоза се клинички манифестовала анемијом, слабом кондицијом и подвличним едемом. Род *Trichostrongylus* је други по значају. Најмање је заступљен у зиму и лето, достиже ниво од скоро 20% у пролеће, а преовлађује у јесењим месецима уз пролив као најважнији клинички симптом трихостронгилидозе. Имајући у виду налаз и сезонску динамику различитих врста желудачно-цревних стронгилида, клинички симптоми забележени код оваца (промењено опште стање, слаба телесна кондиција, подвлични едем, анемија, пролив) на имању у потпуности одговарају синдрому паразитског гастроентеритиса (Катић и сар, 1967; Шибалић и Цветковић, 1996; Aitken, 2007; Taylor и сар, 2007; Scott, 2013).

Налаз различитих врста желудачно-цревних стронгилида оваца на имању је у складу са паразитском фауном оваца у нашој земљи. Појава и преовлађивање врста појединих родова зависи од услова спољашње средине и од самих животиња и различити су у разним подручјима. Према Цветковићу (1976) уопштено се може рећи да код нас нематодироза преовлађује код јагњади и евентуално шиљежади у лето (у брдским подручјима нешто касније), хемонхоза код свих категорија (углавном у низијским подручјима) у касно лето и јесен, трихостронгилоза код јагњади у лето нарочито после одлучивања, а код шиљежади па и одраслих оваца у касну јесен, зиму и пролеће.

Haemonchus contortus је доминантна и веома раширена врста у Бачкој, а прате је врсте из других важних родова попут *Trichostrongylus*, *Ostertagia (Teladorsagia)* и *Nematodirus*, што је у складу са добијеним резултатом. Шибалић и сарадници (1961) су током 1958. радили испитивања код јагњади у Бачкој Тополи, и том приликом установили 10 врста стронгилида. Најзаступљенији је био *Haemonchus contortus* са 46%, а остале врсте су забележене у распону од 0,3 (*Bunostomum trigonocephalum*) до 14,7% (*Ostertagia circumcincta*). Међу бројнијима су биле врсте из рода *Trichostrongylus* са 18,7% (*T. vitrinus* и *T. colubriformis*), следи род *Ostertagia* (16,4%), *Cooperia* (9,9%) и *Nematodirus* са 8,7% (*N. spathiger* и *N. filicollis*). Голошин (1968) је током 1965-1966 године жртвујући по једно грло месечно од априла до јануара испитивао популацију паразита у јагњади на ОД „Камендин“ у Сиригу и установио 13 врста. При томе је најзаступљенији род био *Trichostrongylus* са 45,5% (*T. colubriformis* и *T. axei* у односу 80:20), па *Haemonchus contortus* са 38,7%, док је род *Nematodirus* био заступљен у нивоу од 5,6% (*N. spathiger* и *N. filicollis* у односу 87:13) а *Ostertagia circumcincta* у нивоу од свега 2,5%. Установљен је знатан број одраслих *Haemonchus*-а у сириштима јагњади у касно лето (август и септембар, 5.060 и 4.840 паразита), да би у каснијим месецима знатно опао. Још је од значаја поменути број *T. colubriformis*, који је од лета (510 јединки) до касне јесени достигао максимум (2.980), да би и током зиме остао на нивоу преко 1.000 одраслих. Важно је напоменути и да су јагњад почела са напасањем у јуну, и да су успут прихрањивана концентратима. Неколико година касније (1969.) је на истом имању установљено да је *Haemonchus contortus* повећао популацију, судећи по резултатима копролошког прегледа оваца (Цветковић и сар, 1970). Број јаја у измету појединих животиња је у моменту изласка на пашњак у априлу био у нивоу од 50 до преко 4000 јпг, док је налаз копрокултуре показао доминацију ове врсте (*H. contortus* (74-91%), *Trichostrongylus spp.* (1-2%), *Ostertagia spp.* (0-2%), *Bunostomum sp.* (5-7%), *C. ovina* (0-2%), *Oesophagostomum spp.* (3-12%)). Добијени налаз је веома сличан резултатима копрокултуре из истраживања у оквиру ове докторске дисертације, уз одсуство *Bunostomum sp.*

код оваца на посматраном имању из Србобрана. Копролошким и постморталним прегледом, у периоду март 1971-април 1972 је испитивана популација стронгилида на ПД Карађорђево, и установљено је 15 врста стронгилида, од којих је током године најбројнија *H. contortus*, за којом следе родови *Trichostrongylus*, *Cooperia* и *Nematodirus* (Цветковић и сар, 1973).

У Банату доминира нематодироза и трихостронгилидоза са одговарајућим симптомима, а остале врсте се налазе у различитом броју. У првом истраживању желудачно-цревне стронгилидозе оваца на подручју Војводине, у циљу установљавања узрока угинућа јагњади и оваца на пашњацима на једном пољопривредном добру у околини Вршца током 1957. године, Коста Петровић је вршио дијагностичка клања и том приликом установио 8 врста желудачно-цревних нематода: *H. contortus*, *O. circumcinta*, *T. axei*, *T. colubriformis*, *N. filicollis*, *B. trigonocephalum*, *Oesophagostomum columbianum* и *C. ovina* (Петровић, 1958). Од клиничких симптома је доминирао пролив, и то код 10-20% одраслих оваца и 60-70% јагњади. И поред спровођења терапије, губици код оваца износили су 12,3%, а код јагњади 21,2%. Током 1965 године је у средњем Банату (Кумане) установљено 15 врста стронгилида код заклане јагњади (Цветковић и Лепојев, 1967). Најзначајнији род је био *Nematodirus* (најбројнији *N. spathiger*, па *N. abnormalis* и најмање *N. filicollis*), праћен родовима *Trichostrongylus* (најважнији врста у сиришту *T. axei*, а у танким цревима *T. colubriformis*, мање значајан *T. vitrinus*) и *Ostertagia* (најважнија врста *Ostertagia circumcinta*). *Nematodirus* врсте су најбројније и имају највећи удео у популацији паразита током сезоне. Од априла број паразита се нагло повећава (просек 1.000) и достиже врхунац у јуну (4.000) па у јулу нагло опада (испод 1.000-разлог имунитет, а могуће је да су испитали и природно отпорније јединке-најбоље из запата). У августу број паразита нагло скаче и достиже максимум од око 25.000 у просеку (једно јагње са слузавим проливом имало 35.680 паразита; највише *N. spathiger*, нешто мање *N. abnormalis* и најмање *N. filicollis*). У јесен број паразита опада да би у октобру (око 4.500) достигао ниво из јуна месеца. Паразити из рода *Trichostrongylus* су се акумулирали идући према јесени, а род *Ostertagia* је већи скок имао у средином лета (август). Није забележен налаз *H. contortus*. У Башаиду (северни Банат) је Голошин (1968) током 1966-1967 године установио 16 врста стронгилида. Најзаступљенији је био род *Trichostrongylus* са 58,6% (*T. colubriformis*, *T. axei* и *T. vitrinus* у односу 60:28:12), за којим следи родови *Nematodirus* у нивоу од 27% (*N. spathiger*, *N. abnormalis* и *N. filicollis* у односу 49:41:10) и *Ostertagia* (10,5%) где је *O. circumcinta* била заступљена у популацији са 75%. С друге стране, *H. contortus* је био забележен у нивоу од свега 0,1%. *T. colubriformis* је као најважнија врста у овој популацији у просеку био заступљен у нивоу од 2.897 паразита по јагњету, а достигао је максималан број у зимским месецима (9.680 паразита). Други по важности је био род *Nematodirus* са просечним бројем од 2.225 паразита по животињи а максимум је достигао у касну јесен и током зимских месеци.

Узрочнике желудачно-цревне стронгилидозе оваца са појединих подручја Војводине и уже Србије током 1958. и 1959. године истражују Невенић и сарадници (1960). Прегледом садржаја органа дигестивног тракта на 15 локација (7 у Војводини: Кикинда, Зрењанин, Панчевачки Рит, Вршац, Зобнатица, Сомбор, Сремска Митровица) они су установили 17 врста желудачно-цревних нематода. Најраспрострањенија врста је била *Ostertagia circumcinta*, следе врсте из родова *Trichostrongylus* и *Nematodirus*. При томе је *H. contortus* код јагњади из уже Србије налажен у малом броју, али је зато код оваца и јагњади из Војводине бројност била врло велика. Налажен је

у Бачкој (Зобнатица и Сомбор) и југозападном Банату (Панчевачки рит), а није пронађен код јагњади у Срему (Сремска Митровица), јужном (Вршац), средњем (Зрењанин) и северном Банату (Кикинда). На подручју уже Србије је регистрован код јагњади у региону Београда, у Краљеву и на Златибору. Јагањци из околине Вршца су имали и по 72.500 паразита у дигестивном тракту, а из Бачке Тополе 7.500. Петровић и сарадници (1960) истичу значај нематодирозе код јагњади и оваца у нашој земљи која наноси велике губитке. Примарно су проучавали паразитску фауну оваца на Сјеничко-Пештерској висоравни, и установили да је род *Nematodirus* најзначајнији и да код јагњади највећи број достиже у јесењим месецима (просечно 12.000, мах 22.000 паразита), док код оваца није имао значаја (20-30 паразита у оваца 2-5 година). После овог су најважнији били родови *Trichostrongylus* и *Ostertagia*, док су остали од мањег значаја (забележен је *H. contortus*). Осим на том локалитету, подаци који нису потпуни за још неколико места у средњем (Нови Итебеј, Перлез, Фаркашдин) и јужном Банату (Влајковац код Вршца, Уздин) и у југоисточној Србији (Сурдулица, Пирот) истичу да је нематодироза најважнија паразитоза јагњади, али да се и код одраслих оваца брсте могу наћи у већем броју, што је вероватно условљено локалним екстерним или интерним факторима. Голошин је са сарадницима (Голошин и сар, 1968.) прегледајући материјал са целе територије покрајине у периоду 1956-1967 установио 17 врста желудачно-цревних стронгилида од којих су *H. contortus*, *T. colubriformis*, *T. axei*, *N. spathiger* и *N. abnormalis* означене као најзначајније врсте које изазивају губитке у појединим подручјима, што је у складу са овим резултатима као и са претходним наводима других аутора. На основу резултата Лалошевић и сарадника (2011), свега 36 % испитаних оваца у околини Зрењанина је имало јаја стронгилида (врсте нису одређене), где је је просечан број јаја износио 3.942 јпг уз распон од 100-13.700 јпг. Чак 8 оваца је имало висок ниво инвазије са бројем јаја већим од 1.500 јпг. Имајући у обзир висок ниво јаја, постоји могућност да је присутан и *H. contortus*. Симин и сарадници (2013), су испитујући преваленцу желудачно-цревних стронгилида на 5 локација у Војводини (Локве, Србобран, Нови Сад, Буковац и Ковиљ) пронашли преко 80% позитивних оваца у различитим запатима. У свим местима су били присутни родови *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* и *Oesophagostomum/Chabertia*; *H. contortus* није забележен само у стаду са обода Новог Сада, а род *Cooperia* је пронађен само у Ковиљу. Трећини од укупног броја оваца је потребно апликовати антихелминтике јер су биле заражене у умереном одосно високом нивоу, што је процењено на основу броја јаја и савремених препорука (Abbott и сар, 2009).

У Мачви, код оваца са подручја Шапца (Шабац и Кленак) су најчешћи и најбројнији паразити *Ostertagia*, *Trichostrongylus* и *Haemonchus*, а удружени са великим метиљем инвадирају овце у слабом до средње јаком степену (Вујић и Анић, 1958).

У ширем подручју Београда је између марта 2009 и јануара 2010 године прегледан 91 запат оваца и коза и установљено 16 врста желудачно-цревних стронгилида (Pavlović и сар, 2012). Према налазима, међу малим преживарима су веома раширене најпатогеније врсте (преваленца од 89-100%) *H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. colubriformis* и *T. axei*. Друге врсте попут *Cooperia curticei*, *Trichostrongylus capricola* и *C. ovina* су биле заступљене у 60% животиња, док су остале врсте пронађене у распону од 5-28% (*Skrjabinema ovis*, *S. caprae*, *O. venulosum*, *B. trigonocephalum*, *Marshallagia marshalli*). Род *Nematodirus* је такође веома раширен; преваленца *N. spathiger* је била 100% а *N. filicollis* око 43%. Врсте из родова *Ostertagia* (*Teladorsagia*), *Trichostrongylus* и *Nematodirus* су од појављивања у рано пролеће (март) биле присутне током целе године уз константно повећавање њихове бројности која је током пашне сезоне достигла максимални ниво. Налаз *H.*

contortus је повезан са топлијим периодом године (од јула месеца) док се *Marshallagia marshalli* може пронаћи у хладнијем периоду (од новембра).

У источној Србији, на подручју Хомољских планина, постоји 23 врсте стронгилида. У старијих оваца у пролеће преовлађују *Trichostrongylus* и *Nematodirus* врсте, током лета и јесени род *Ostertagia*; род *Trichostrongylus* је бројан током зиме и представља скоро једину популацију паразита у том периоду (Катић и сар, 1967). Према недавном налазу из источног дела земље, када је од марта 2011 до новембра 2012 године прегледано 680 оваца и јагњади, и установљено је присуство 11 родова желудачно-цревних стронгилида у око 75% животиња, најзаступљенији родови су били *Haemonchus* (око 47%), *Oesophagostomum* (41%), *Trichostrongylus* (40%), *Nematodirus* (36%) и *Chabertia* (33%), док су остали забележени у мањем проценту (од 11% (*Trichuris* spp.) до 26% (*Ostertagia* spp.) (Kulišić и сар, 2013). Од 408 одраслих оваца, 8% није било инвадирано нематодама. Преко 60% позитивних оваца је имало умерен односно висок ниво инвазије, што указује на могуће губитке које желудачно-цревне стронгилиде изазивају у овом делу земље и да је стога потребно применити меру дехелминтизације.

У региону Златибора (западна Србија) су Цветковић и сарадници (1966) утврдили укупно 18 врста стронгилида након клања јагњади на крају две пашне сезоне (1963. и 1956. године, околина Косјерића). Након првог периода је установљено да су најзаступљеније врсте из родова *Trichostrongylus* и *Nematodirus*, док су *Ostertagia* и *Cooperia* нађене у мањем броју од претходних а ипак у већем броју од осталих врста. *H. contortus* је код неких јагњади био заступљен у врло малом броју, али је код других премашивао и 2.000 јединки. У другој години су такође преовлађивали *Trichostrongylus* и *Nematodirus*, док је *Ostertagia* и *Cooperia* врста било далеко мање. У односу на претходну сезону, хемонхуса је било веома мало, изузев код једног јагњета где је нађено 1.232 примерка. Важно је напоменути да је 1963. била сушна и топла, а 1964. је била година са више падавина. Доминацију наведених родова код јагњади са Златибора су потврдили и Вујић и сарадници (1976)

Што се тиче југозападне Србије, поменуте налазе паразитске фауне Петровића и сарадника (1960) да су на Сјеничко-Пештерској висоравни најважнији родови *Nematodirus*, *Trichostrongylus* и *Ostertagia* потврђују Крџалић (1966) и Бошковић и Марковић (1981). Крџалић је утврдио да је у одраслих оваца доминантна трихостронгилидоза где се може наћи и до 10.000 одраслих у цревима, нарочито у зимским месецима. Насупрот овоме, број одраслих паразита *Nematodirus* spp. је по овци био свега 100-200 примерака. Код јагњади је налаз потпуно супротан. Бошковић и Марковић су у једном стаду копролошки прегледали 20 шиљежади старих око 8 месеци и 24 овце старости од 3-5 година и нашли преко 2.000 јпг код већине животиња. Преко од 50% укупног броја јаја је припадало роду *Nematodirus*, што указује да у појединим стадима на брдско-планинским пашњацима нематодироза може бити значајна и код одраслих оваца, што је у складу са налазима Петровића и сарадника (1960) код оваца у равничарском пределу (Нови Итебеј у Банату).

Интензитет инвазије је код одраслих оваца на имању процењен на основу броја јаја према поменутим критеријумима. Просечан број јаја желудачно-цревних стронгилида је био око 1.200 јпг уз распон од 0-9.020 јпг. Што се тиче рода *Nematodirus*, укупан просечан број јаја је износио око 20 јпг (распон 0-390 јпг). Највећи просечан број јаја стронгилида је био у зиму (око 1.700 јпг) и лето (око 1.600 јпг), нешто мањи у пролеће (око 1.000 јпг) а најмањи у јесен (близу 800 јпг), уз велика одступања на индивидуалном нивоу (графикон 8). С друге стране, просечан број јаја *Nematodirus*

spp. је од највишег нивоа који је установљен у зиму (око 60 јпг), константно опадао до краја сезоне (8 јпг) (графикон 9).

Налаз у односу на интензитет инвазије је много повољнији за род *Nematodirus* где је више од 65% оваца је током прегледа било негативно. Скоро уједначен је проценат оних са ниским нивоом (око 16%) и умереним нивоом инвазије (око 18%), док ниједна овца није имала висок ниво инвазије паразитима из овог рода. Како је напред у тексту изнето, нематодироза је карактеристична пре свега за јагњад, и само у посебним околностима може имати значаја код одраслих оваца. Код ове категорије је на имању најчешће регистрован низак степен инвазије, и донет је закључак да род *Nematodirus* није значајан патоген, управо због чињенице да се јагњад не напасају, те даља дискусија није потребна.

Највише оваца са високим нивоом инвазије желудачно-цревним стронгилидама (преко 40%) био је у зиму и лето, мање у пролеће а најмање у јесен (Графикон 11). Умерен ниво инвазије је скоро уједначен током године (око 30%) осим у јесењем периоду, када је био скоро упола мањи од осталих годишњих доба. Највише оваца са ниским нивоом инвазије, као и негативних оваца, је било у јесењем периоду, и то укупно преко 60%; то су животиње које није потребно третирати антихелминтицима у моменту прегледа. У периоду пролећа, тај проценат је преко 40, док је у зиму и лето било око 25% оваца које су биле негативне или су имале низак ниво инвазије.

Делимичан увид у губитке које желудачно-цревне стронгилиде изазивају у другим регионима се може стећи помоћу „индекса патогености“ (Abbott и сар, 2009). Развијен је систем оцењивања патогености на основу укупног броја стронгилида код јагњади где се 1 поеном вреднује број од 500 одраслих *H. contortus* (или 3.000 *Teladorsagia* spp.=4.000 *Trichostrongylus* spp.=4.000 *Nematodirus* spp.=4.000 ларвених стадијума паразита). Скор од 2 поена у јагњади највероватније већ доводи до мерљивог пада продуктивности, иако се клинички знаци и угинућа најчешће јављају када збир пређе 3 поена. Са узрастом се повећавају и граничне вредности, тако да то треба узети у обзир код интерпретације индекса патогености код одраслих оваца.

Поређење резултата интензитета инвазије оваца из Србобрана је урађено само за регион Бачке у ком доминира хемонхоза, и то само са оним публикацијама где је доступан број јаја. У Бачкој Тополи где доминира *H. contortus*, установљен је умерен и висок ниво инвазије код јагњади уз распон броја јаја од 600-13.000 јпг. Укупан број одраслих паразита у закланих животиња је био између 230-7.000 (Шибалић и сар, 1961). Детаљи о броју јединки које су биле највише инвадиране нису наведени. На имању ПД „Карађорђево“ је од три расе оваца (цигаја, мерино прекос и мерино кавказ), раса мерино кавказ била најмање отпорна на инвазију (Цветковић и сар, 1973), па су подаци приказани само за ту расу. Стадо је истерано на пашу средином априла, изузев јагњади која су започела напасање нешто касније. Од прве трећине јуна, просечан број јаја код јагњади прогресивно расте, да би највиши ниво од 1.700 јпг достигао у септембру. Код шиљежади је пик у елиминацији јаја био у рано пролеће (крај марта-почетак априла) са просечним нивоом од 4.900 јпг, што је веома високо. Према ауторима, ово је последица слабљења отпорности преко зиме када је у пролеће дошло до реактивације ларвица које су биле у хипобиози.

Слично као за шиљежад, код одраслих оваца је највећи просечан ниво јаја од 5.000 јпг елиминисан у рано пролеће пре изгона на пашу, што указује да је ниво инвазије на почетку пашне сезоне знатно виши у односу на имање из Србобрана где је просечан број јаја пет пута мањи. Узрок оваквог налаза може да буде различито време јагњења оваца у два упоређена стада. У

Карађорђевићу је дошло до познатог феномена после-порођајног повећања броја јаја (post parturient rise) због слабљења имунитета у перипарталном периоду након јагњења у касну зиму/рано пролеће (Цветковић и сар, 1973). У Србобрану се овце углавном јагње између октобра и децембра, па је зато број јаја (и степен инвазије) највећи у зимском периоду и износи 1.700 јпг (уз напомену да налаз ипак треба узети са резервом због малог броја прегледаних оваца у односу на друге периоде). Поред овога, зими је свакако слабија исхрана што умањује отпорност оваца (ојагњених и јалових) и додатно доприноси таквом налазу јер се активирају хистотрофне форме. У Карађорђевићу је током зиме код оваца константно растао број јаја, из истих разлога (Цветковић и сар, 1973). Пошто су се овце у Србобрану ојагњиле 3 месеца раније, у рано пролеће су јагњад већином залучена, што се поклапа растом младе, протеинима богате траве, па се овце опорављају јачајући организам и долази до феномена „самолечења“ (self cure). Друго, у нормалним годинама је мали број ларвица (нарочито *H. contortus*) доступан у пролеће на пашњаку због повећаног морталитета током неповољних зимских температура. Током сезоне у овом запату број јаја расте и достиже пик у лето што је последица реинфекције ларвицама *H. contortus* чији је број посебно висок у повољним годинама. Овце које контаминирају пашњак у пролеће су најважнији извор јаја односно ларвица. Међутим, последњих година се не сме занемарити могућност да ларвице у већој мери преживе неповољне услове, имајући у виду све блаже зиме уз одсуство веома ниских температура које трају неколико месеци, као што је то било раније. У Карађорђевићу, феномен самолечења започиње касније па је почетком лета број јаја најмањи и временом полако расте, да би крајем лета достигао максимум од око 850 јпг, што је дупло мање у односу на овце из Србобрана. У Србобрану је најмањи интензитет инвазије у јесењем периоду (око 800 јпг) што одговара напасању животиња на ораницама после жетве соје и бербе кукуруза. Осим што нема реинфекције ларвицама које се налазе на перманентном пашњаку, зрневље даје организму потребну енергију у борби против паразита, посебно соја, познато протеинско храниво. Овце у Карађорђевићу су у том периоду елиминисале између 550 јпг средином и 900 јпг крајем јесени. Није познато да ли се напасају на ораницама.

Уз приказ просечних вредности, за овце из Србобрана је у сваком годишњем добу приказан и распон у броју јаја стронгида који је био веома широк. Забележене су велике разлике у броју јаја на индивидуалном нивоу, што је потпуно у складу са резултатима у Карађорђевићу и Камендину (Цветковић и сар, 1970; Цветковић и сар, 1973). Највећа FEC вредност од 9.020 јпг је забележена у летњем периоду који је део године када је хемонхоза најинтензивнија. Важно је споменути налаз овце угинуле у јулу 2013. године због хемонхозе која је имала скоро 65.000 јпг стронгида. Нажалост те године није било додатне енумерације јаја других оваца у том тренутку, што би можда додатно утицало на резултате.

С друге стране, појаву клиничке хемонхозе (први случај у Србији) праћене угинућима, уз прилично висок број јаја, су забележили Цветковић и сарадници (1970) код мерино оваца у Сиригу (Камендин), такође током летњих месеци. Слабљење већег броја оваца се појавило крајем јула и било је праћено угинућем једне овце, док је изразита мршавост настала у августу и септембру. Тада се клиничка слика нагло појавила код извесног броја оваца ојагњених почетком јула. Оболене овце су биле веома слабе, апатичне и малаксале уз изражену анорексију. Дисале су убрзано и тешко, уз невољно кретање за стадом. Забележено је бледило видљивих слузокожа, вуна је била сува и лако је испадала. У последњем стадијуму се појавио подвилични едем као израз крајње

анемије, и све овце су угинуле 3-6 дана после његове појаве. Није било пролива, него је измет био веома тврд и црн. Копролошки и хематолошки преглед су урађени код две овце са подвличним едемом (једна је жртвована и пребројани су адулти у дигестивном тракту) и код две мршаве овце без других изражених симптома.

Паразитолошки налаз је био следећи:

- овца 1: 36.400 јпг (подвлични едем);
- овца 2: 27.200 јпг (подвлични едем) + око 30.000 одраслих *Haemonchus*-а и мање осталих стронгилида;
- овца 3: 3.600 јпг (слабост);
- овца 4: 2.000 јпг (слабост).

Код осталих оваца је копролошким прегледом установљено пар стотина до 4.000 јпг, што је углавном зависило од протеклог времена после јагњења.

У оквиру секције, прегледана су три сиришта од једне жртвоване и две угинуле овце. Слузокожа је била едематозна. Код једне овце је било дифузне хеморагије на слузници уз налаз знатне количине крви у лумену органа. Многобројна тачкаста крварења су била присутна у органима друге две овце. Макроскопски патоанатомски налаз прегледаних сиришта оваца из Србобрана је у потпуности у складу са теренским налазима из Сирига (Цветковић и сар, 1970) које такође одговарају патолошким променама које изазива хемонхоза (Катић и сар, 1967; Taylor и сар, 2007; Jabbar и сар, 2013). При томе ваља напоменути да у Србобрану није у свим случајевима присуство паразита довело до тешких оштећења слузнице, што је пре свега зависило од њиховог броја у сиришту који се разликовао у зависности од године.

Индикације да је хемонхоза била веома изражена у лето 2013. године су налаз опсежних крварења у сиришту код поменутих угинуле овце и ниске оцене добијене након прегледа свих оваца FAMACHA® дијаграмом за семиквантитативну процену анемије. Значајно побољшање FAMACHA® оцена након третмана клозантелом (који има узак спектар делујући против *H. contortus*) и левамизолом (мањи број оваца) потврђује ову хипотезу, уз напомену да је дехелминтизација била једина мера и да није било побољшања у исхрани.

Слично овом налазу, Цветковић и сарадници (1970) су установили у Сиригу да се код овце која је имала изражену анемију услед тешке хемонхозе (FEC=36.400 јпг; подвлични едем, слабост) број еритроцита повећао више од 4 пута након 30 дана од третмана тиабендазолом (са $2,15 \times 10^{12}$ на $9,29 \times 10^{12}$). Хематолошки налаз је за друге две овце показао мањи почетни степен анемије ($6,92 \times 10^{12}$ и $7,75 \times 10^{12}$) због мањег нивоа инвазије (FEC=2.000 и 3.600 јпг), па је и повећање броја еритроцита било мање (око 1,3 пута).

Многа истраживања предвођена налазима у Јужној Африци су показала да је FAMACHA® дијаграм користан алат за проналажење анемичних оваца поредећи оцене са вредностима хематокрита (Malan и сар, 2001; van Wyk и Bath, 2002; Kaplan и сар, 2004; Burke и сар, 2007; Scheuerle и сар, 2010; Sotomaior и сар, 2012; Papadopoulos и сар, 2013; Chylinski и сар, 2015). На тај начин се идентификују тачно оне овце којима је дехелминтизација неопходна и смањује се број третираних животиња што чува ларвице осетљиве на антихелминтике (тзв. „refugia“) у довољном броју да би се разредила резистенција (Vatta и сар, 2001; van Wyk, 2008; Molento и сар, 2009).

Међутим, постоји и низ резултата других аутора који указују да дијаграм у испитаним локалним условима није био нарочито успешан у проналажењу анемичних оваца (Koortmann,

2007; Di Loria и сар, 2009; Moors и Gauly, 2009; Mederos и сар, 2014). То је у складу са налазом истраживања спроведеног код оваца на имању у Србобрану, где је забележена негативна корелација између хематокрита и FAMACHA® оцена ($\rho = -0,2446$) и хематокрита и броја јаја ($\rho = -0,002$), што значи да ни број јаја ни FAMACHA® скор нису били добар алат да тачно процене ниво анемије код оваца у условима на фарми у јесен 2014. године, што је у складу са налазом других аутора (Mederos и сар, 2014). С друге стране, постојала је слаба позитивна корелација између FAMACHA® оцена и броја јаја али без статистичке значајности ($\rho = -0,0907$, $p = 4752$). Просечан број јаја у време ових испитивања је био свега 832 јпг, што значи да инвазија *H. contortus* није била изражена код већине оваца (мада је било оних са високим нивоом FEC (мах око 5.900 јпг)), што је вероватно узрок лошег резултата FAMACHA® дијаграма. Ако се ефекат хемонхозе посматра на основу броја јаја, јасно је да је овај ниво сувише низак да изазове јачи степен анемије код одраслих оваца, судећи по резултатима других аутора (Цветковић и сар, 1966; Цветковић и сар, 1970). Код три јагњета у Косјерићу (Цветковић и сар, 1966) је маркантна анемија ($2,5 \times 10^{12}$; $3,9 \times 10^{12}$ и $3,4 \times 10^{12}$) наступила у септембру 1963. (повољна година за хемонхозу) за нивое јаја (FEC=4.000, 4.500 и 5.700) који су у рангу са максималним FEC вредностима одраслих оваца у Србобрану. Већ поменуте две овце из Сирига (Цветковић и сар, 1970) које су имале сличан број јаја (FEC=2.000 и 3.600 јпг) као овце из Србобрана, су имале блажу анемију ($6,92 \times 10^{12}$ и $7,75 \times 10^{12}$) у поређењу са јагањцима из Косјерића (референтна вредност је $10-13 \times 10^{12}$; Ђурђевић, 1992).

У поређењу боје коњуктиве ока са бојама на FAMACHA® картици, испитиване овце јесу имале клиничку анемију. Постоји могућност да је нормална боја коњуктиве виртемберг оваца мањег интензитета него раса оваца у Јужној Африци које су коришћене за калибрацију FAMACHA® дијаграма у односу на вредности хематокрита, јер постоји такав случај забележен за две немачке расе оваца (Moors и Gauly, 2009). Chylinski и сарадници (2015) су забележили да на осетљивост FAMACHA® дијаграма може утицати способност различитих изолата *H. contortus* да доведу до анемије (што зависи од њихове патогености). Di Loria и сарадници (2009) на то додају још и разлике у географским, климатским, хранидбеним, репродуктивним и узгојним факторима између различитих студија.

Цветковић и сарадници (1966) налазе да углавном јагњад заражена великим бројем *H. contortus* имају најизраженију анемију. Међутим, једно јагње са изразитом анемијом је имало најмање *H. contortus* (30 јединки), али је зато имало велики број *T. axei* (6.550) и *Nematodirus* врста (40.000). Познато је да *Nematodirus* не изазива анемију, али је могуће да *Trichostrongylus* врсте узимањем знатних количина витамина и микроелемената из цревног садржаја доводе до анемије (Цветковић и сар, 1966), јер раније доказано да је изазива *T. axei* код неухрањене јагњаци (Gibson, 1954). Пошто је у Србобрану на јесен 2014. било мање *H. contortus* него иначе (59%) а више *Trichostrongylus* (35%) (резултати културе за новембар 2014. који нису приказани посебно), могуће је да је услед мање микроелемената дошло до хипохромне анемије која је утицала на резултате FAMACHA® оцена.

Цветковић и сарадници (1970) су запазили да постоји неуједначеност у погледу побољшања броја еритроцита и количине хемоглобина код оваца након лечења хемонхозе. Док се број еритроцита брзо побољшавао и за релативно кратко време достигао физиолошке вредности, количина хемоглобина се повећавала спорије и до 40-ог дана није потпуно достигла нормалне вредности, када су престали са мерењима. У испитивањима FAMACHA® дијаграма у оквиру

дисертације је коришћен само хематокрит по угледу на друга истраживања, а није урађена комплетна крвна слика са диференцирањем крвних елемената као ни хематолошки индекси. Боља процена повезаности FAMACHA© оцена са вредностима хематокрита се може постићи уз потпун хематолошки налаз и посебно одређивање количине хемоглобина од кога зависи индекс обојења еритроцита. Осим тога, важно је испитати могућност дијаграма да дијагностикује анемију у различитим периодима током године, чак и неколико година, што је у складу са препорукама француских научника да FAMACHA© треба да се калибрише за сваку фарму посебно спрам локалних специфичних услова (Chylinski и сар, 2015).

У претходном делу дискусије је приказано да је у Бачкој хемонхоза веома заступљена, али да је постала важна и у другим деловима Војводине и уже Србије где је раније није било или је била заступљена у мањем обиму, судећи према последњим извештајима који су забележили присуство паразита (Pavlović и сар, 2012; Kulišić и сар, 2013; Симин и сар, 2013) или је закључак донет на основу високог броја нађених јаја (Лалошевић и сар, 2011). Налази високих FEC вредности у присуству *H. contortus* значе висок ниво инвазије (Abbott и сар, 2009) у домаћим стадима оваца, што је у складу са налазом на имању у Србобрану. Даљим испитивањима вредности примене FAMACHA© дијаграма у процени анемије оваца у садашњим епизоотиолошким условима вреди поклонити пажњу у будућности. Осим тога, код тешко инвадираних животиња је потребно применити дехелминтизацију или неку другу меру у циљу ефикасне контроле која би обезбедила здравље, добробит и високу продуктивност.

6.2. Ефикасност ивермектина

6.2.1. Ефикасност против стронгилида

Резултати FECR тестова показују да је током година редукција јаја веома варијала. У зависности од године и сезоне испитивања, ефикасност ивермектина у различитим групама се кретала од 67 до 99% (поглавље **РЕЗУЛТАТИ**).

У 2012. години је редукција јаја након терапије ивермектином била 99% и није било сумње да постоји резистенција јер је његова ефикасност била веома висока. Међутим, разлози за слабије напредовање оваца након терапије препаратом Alfames 1%® у 2011. нису истражени, па је током 2013. испитано пет различитих формулација ИВМ имајући у виду да је у литератури забележена неједнака ефикасност различитих комерцијалних препарата антихелминтика против стронгилида која може бити последица нестандардног квалитета појединих серија доступних на тржишту (Bentounsi и сар, 2003; Bentounsi и сар, 2009; van Wyk и сар, 1997).

Први налаз резистенције на ивермектин је на имању (а уједно и у Србији) забележен 2013. године за препарат Promectine® када је ефикасност ивермектина била 92% а доњи 95% интервал поверења 80, док је за други препарат (Pandex®) постојала сумња на резистенцију. Изузимајући AP статус, за све препарате је редукција јаја била изнад 90% без значајне разлике међу њима што се, према Powers-у и сарадницима (1982), сматра виском ефикасношћу. Подједнака ефикасност различитих препарата искључује могућност да је резистенција на ивермектин последица нестандардног квалитета било које од коришћених формулација на испитиваном имању. Налаз субоптималне ефикасности ивермектина (у односу на WAAVP критеријум за резистенцију) након

FECR тестова урађених за 5 различитих препарата из 2013. је окарактерисан само као прелиминарни доказ о присуству резистенције желудачно-цревних стронгилида оваца (Симин и сар, 2014).

Постоји неколико разлога за овакво тумачење резултата. Ако се резултати анализирају помоћу формуле Dobson-а и сарадника (2012) када се за израчунавање процента редукције јаја и 95% ИП користи „сирови“ број јаја узорка пре множења са одговарајућим фактором („raw counts“), уз помоћ исте формуле (формула 2; McKenna, 2006) мењају се 95% ИП за оба препарата па је AP статус сада другачији: сумња на резистенцију за Promectine® (ПР=92%; 95% ИП: 90-93) и потпуна ефикасност за Pandex® (ПР=96%; 95% ИП: 95-97). У истраживању које су урадили Rinaldi и сарадници (2014) испитујући ефикасност антихелминтика такође помоћу исте формуле (формула 2; McKenna, 2006), забележен је учинак нетобимина на једној фарми оваца од 92% након првог тестирања (налаз резистенције), а 100% након поновљеног тестирања спроведеног за годину дана уз укључење контролне (нетретиране) групе оваца и рачунања ефикасности помоћу формуле 1 (Coles и сар, 1992).

Испитујући поновљивост FECRT, Miller и сарадници (2006) су у неколико испитиваних група јагњади пореклом из истог запата установили варијабилну ефикасност ивермектина. Аутори препоручују опрез у тумачењу резултата FECRT тамо где је ефикасност у интервалу 90-95%, управо због могуће варијабилности теста и посебно налаза лажно негативних резултата (Miller и сар, 2006), што је у складу и са налазима Calvete и Uriarte (2013). Ефикасност Promectine® је била у спорном интервалу, што је отежало тачну интерпретацију налаза. Levesque и сарадници (2012а) су закључили да ће увек постојати интервал стварне ефикасности лека („true drug efficacy“) где је тумачење FECR теста нејасно, који је за критеријум од 95% (WAAVP) у распону од 92,5-97,5%. Lyndal-Murphy и сарадници (2014) такође подржавају тезу пажљиве интерпретације налаза у спорном интервалу 90-95%, нудећи примену строжијег критеријума за тумачење FECRT који подразумева проглашавање резистенције када је горњи интервал поверења <95% (критеријум 2). Ако се у пракси за FECRT ипак користи (чешћи) WAAVP критеријум, онда би критеријум 2 требало примењивати уз њега, поготово у случају спорног интервала ефикасности (Lyndal-Murphy и сар, 2014).

У циљу потврде (прелиминарног) налаза резистенције из 2013. године (Симин и сар, 2014) је постављен нови оглед у мају 2015. Урађени су вишеструки FECR тестови са више испитиваних група из истог стада (по Miller-у и сар, 2006), уз присуство контролне групе и коришћења стандардизованих FECRT поступака и формула које препоручује WAAVP (Coles и сар, 1992; Coles и сар, 2006). Уместо McMaster технике, сада је за квантификацију јаја стронгилида оваца коришћен Mini FLOTAC (Cringoli и сар, 2013). Резултати тестирања из маја 2015. су показали значајну варијабилност у редукцији јаја између група ($p=0,001$). Овога пута је ефикасност ивермектина, према класификацији Powers-а и сарадника (1982), у две групе била ниска (60-80%; групе T₂ и T₃) а у две висока (преко 90%; групе T₁ и T₄), али је у свим групама била субоптимална чиме је прелиминарни налаз резистенције на ивермектин (Симин и сар, 2014) и потврђен.

Варијабилност у ефикасности ивермектина између 4 испитиване групе је слична већ поменутој коју су пријавили Miller и сарадници (2006) примењујући различите формуле. У њиховом истраживању је распон редукције јаја од 52-90% израчунат формулом 2 (по McKenna, 2006) био значајно већи у односу на примену формуле 1 (по Coles и сар, 1992) где се кретао у

нивоу од 85-96%. Имајући у виду такве резултате, да ли би предност приликом FECRT требало дати примени формуле 1 (WAAVP- Coles и сар, 1992; Coles и сар, 2006)? Да ли би њена употреба допринела мањој варијабилности вишеструких FECRT код оваца из истог запата? На глобалном нивоу нема консензуса да је формула 1 најприкладнија за испитивање ефикасности антихелминтика против ГИН преживара FECR тестом. Осим за ову, дебата се води и за друге формуле које могу бити просте или сложене, углавном због укључивање контролне групе, и у том случају на учесталост бројања јаја (да ли бројати и на „Дан 0“ или само на „Дан 14“ (пример за МЛ)) што утиче на дужину лабораторијског рада а тиме и на цену тестирања (McKenna, 2006a). Многи аутори су упоређивали постојеће FECRT формуле, са аспекта поузданости и прецизности, доносећи различите закључке на основу сопствених резултата (нпр. Cabaret и Berrag, 2004; McKenna, 2006; McKenna, 2006a; Levecke и сар, 2012a; Calvete и Uriarte, 2013; Lyndal-Murphy и сар, 2014; Falzon и сар, 2015). McKenna (2006) наводи да је, без обзира на примену различитих формула, вероватно да ће све резултати сличним проценама ефикасности антихелминтика. Даљом анализом њихове осетљивости и специфичности упоређујући их са „златним стандардом“ у дијагностици резистенције –контролним тестом (Johansen, 1989), McKenna (2006a) је закључио да сложеније формуле неће допринети бољим перформансама од простих јер су сличне осетљивости (међу простије формуле спадају оне које су коришћене овде: формуле 1 и 2 (формула 2 само у случају испитивања једног препарата)). Calvete и Uriarte (2013) су помоћу Monte Carlo симулације испитивали, са практичне стране, најпогодније FECRT протоколе за рутинску примену на фармама и закључили да је формула 2 прикладнији начин за испитивање AP од формуле 1 која укључује контролну групу. Контролна група може бити значајан извор грешке ако се корективне мере, које подразумевају претходно балансирање нивоа јаја у Т и К групи (пре теста, што није принцип који користи формула 1), не примене. Lyndal-Murphy и сарадници (2014) наводе да је у ситуацијама када се током FECRT теста наставља развој ларвица у овцама неопходно укључити контролну групу да би се пратило повећање у броју јаја што води прецизнијој интерпретацији теста. Увидом у флукуацију броја јаја контролне групе током првог FECR теста (Табела 12), следи да је увођење контролне групе за потврду резистенције у мају 2015. потпуно оправдано. На основу поређења различитих FECR формула у рачунању ефикасности антихелминтика код оваца у пределима са умереном климом, и Falzon и сарадници (2015) препоручују формулу 1, поготово за рутинску контролу на фармама малих преживара, без обзира на висок или низак ниво AP (>85%, односно <35%). Наводе да је присуство контролне групе у FECR тестовима, било да се користе просте или сложене формуле, математички коректније за детектовање стварне ефикасности антихелминтика.

У испитивању ефикасности ИВМ на имању ниједном нису коришћена јагњад него овце старости преко 1 године, због тога што се јагњад на газдинству најчешће не напасају. Одрасле овце имају развијен имунитет против желудачно-цревних стронгида, за разлику од јагњади која га стичу сазревањем почев од 4-7 месеца живота (Sutherland и Scott, 2010). То је важно истаћи због тога што се не може искључити утицај имунокомпетентне одрасле индивидуе на елиминацију јаја стронгида која може имати допринос на забележену варијабилност вишеструких FECRT. Добро је познато да осим разлике у имунитету на старосном нивоу, постоји и разлика у пријемчивости како између различитих раса оваца тако и у оквиру јединки исте расе (Цветковић и сар, 1973). Упркос постојању варијабилности, у мају 2015. је у свим групама дијагностикована резистенција, као и у истраживању Miller-а и сарадника (2006). Коментаришући своје налазе, ови научници кажу

да охрабрује поновљивост FECR теста у стадима са ниским ефикасностима антихелминтика, те да је он зато поуздан алат у дијагностици AP.

С друге стране, не сме се заборавити познато ограничење FECR теста који може да утврди постојање резистенције на антихелминтик тек онда када је најмање четвртина испитиване популације паразита резистентна (Martin и сар, 1989). Ради повећања дијагностичке осетљивости FECRT, препоручују се прецизније квантитативне копромикроскопске технике (Levesque и сар, 2012a; Calvete и Uriarte, 2013) велике аналитичке осетљивости попут FLOTAC апарата ($Se=1$) (Cringoli и сар, 2010; Levesque и сар, 2012). У прилог исправности добијених резултата који потврђују први налаз резистенције у Србији, иде примена савременог Mini FLOTAC уређаја. Ова нова техника за бројање паразитских елемената аналитичке осетљивости 5 јпг (Cringoli и сар, 2013) има десет пута већу од методе по McMaster-у ($Se=50$ јпг) која се традиционално користи у FECRT на основу препорука WAAVP (Coles и сар, 1992; Coles и сар, 2006). Осим доказане поузданости у тестирању ефикасности антихелминтика код оваца (Rinaldi и сар, 2014), Mini FLOTAC апарат се показао као метода која је погодна за употребу због своје једноставности.

Како су резултати AP потврђени, у октобру 2015. је коришћен McMaster метод за проверу ефикасности ивермектина. Резултати овог FECRT су поново потврдили присуство резистенције са процентом редукције јаја од 80%, уз веома лошу (скоро занемарљиву) ефикасност код појединих јединки (Табела 18). Четири овце са високим бројем јаја стронгилида после третмана, су обезбедиле резистентни изолат, претежно из рода *Trichostrongylus*, за испитивање *in vitro* интеракције са *D. flagrans* MUCL 9827.

Популација ларвица након третмана ивермектином показује да увек, без обзира на сезону (пролеће, лето или јесен) доминира род *Trichostrongylus*. Тек 2015. су 14 дана од третмана пронађени родови *Haemonchus* и *Teladorsagia*. Рачунањем генеричке ефикасности ивермектина после FECRT у мају 2015., несумњиво је доказана резистенција код рода *Trichostrongylus* са распоном ефикасности од 33-80%. Налаз редукције јаја од 93% (95% ИП: 83-97) такође указују на резистенцију рода *Teladorsagia*, док је за род *Haemonchus* резистенција посумњана (ПР=97%; 95% ИП: 89-99).

Налаз *Teladorsagia* и *Haemonchus* после терапије ивермектином се можда могао и очекивати имајући у виду генерички састав копрокултуре након првог FECR теста из 2012. године. Тада је 14-ог дана од третмана био присутан само род *Trichostrongylus*, а 29-ог дана су идентификовани и родови *Haemonchus* и *Teladorsagia* (са 8 и 3% присутних ларвица, тим редом; Графикон 13). Појава ова два рода је последица наставка развоја незрих ларвица присутних у слезници сиришта (Lyndal-Murphy и сар, 2014) после елиминације популације одраслих хелмината. О томе сведочи и промена у броју копролошки позитивних оваца 14-ог (7 јединки) и 29-ог дана (12 јединки) после третмана. Sargison (2011) наводи да је један од разлога који повећава ризик селекције на AP примена антихелминтика у периодима када постоји значајан део пропорције нематода које су у раном L_4 стадијуму (у хипобиози) када их је тешко убити. То је могло да допринесе настанку резистенције, како код родова *Haemonchus* и *Teladorsagia*, тако и код рода *Trichostrongylus* имајући у виду да се код желудачно-цревних стронгилида оваца феномен хипобиозе јавља и лети (у мањем обиму) и зими (Sutherland и Scott, 2010). Ипак, у складу са поменутиим ограничењима која се односе на интервал редукције јаја од 90-95% (Miller и сар, 2006; Lyndal-Murphy и сар, 2014), постоји реална сумња у појаву резистенције код рода *Teladorsagia*. Због

чињенице да се *Teladorsagia* слабије развија у копрокултури у односу на *Trichostrongylus* (Dobson и сар, 1992), могуће је да је реалан проценат резистентних стронгилида овог рода потцењен. Ефикасност ивермектина против *Haemonchus* и *Teladorsagia*, два веома значајна рода стронгилида присутна на имању, је стога потребно додатно истражити и континуирано пратити.

Посматрањем броја јаја и популације ларвица након третмана ивермектином током неколико урађених FECR тестова се стиче увид у прогресију развоја резистенције код рода *Trichostrongylus* на имању. Ако се анализира број јаја на појединачном нивоу, евидентно је да је током година повећан број оваца са порастом броја јаја 14 дана од третмана. Анализирајући податке из 2012, види се да ниједна овца није имала преко 500 јпг *Trichostrongylus*, и да све имају низак ниво инвазије. Тај број јаја није значајан са аспекта здравља животиња, али јесте са аспекта контаминације пашњака, јер се на тај начин шире гени резистентног изолат (Martin и сар, 1989; Cornell и сар, 2000; Cornell и сар, 2003) што може да доведе до озбиљних последица ако се AP значајно прошири као што је забележено у литератури (Mahieu и сар, 2014). Захваљујући феномену просторне агрегације развојних облика резистентних хелмината на пашњаку, значајно се увећава и степен инвазије оваца одраслим резистентним стронгилидама (Cornell и сар, 2000). То је, у случају појединачних животиња, резултирало повећањем броја јаја након третмана током времена, тако да 2013. код неколико оваца у појединим групама скоро достиже доњу границу умереног нивоа инвазије од 500 јпг, који је значајан и са аспекта здравља и контаминације околине. У последњој (2015.) години испитивања, по три овце у мају и октобру су имале преко 500 јпг 14 дана након третмана (3 животиње близу, а 1 преко 1000 јпг). Нарочито је потребно истаћи да је код једне овце у октобру редукција јаја била само 7 % (1100 пре а 1025 јпг после третмана), где је потпуно јасно да овој животињи терапија ивермектином са клиничког аспекта није ништа значила.

Просторну агрегацију инфективних облика желудачно-цревних стронгилида (Cornell и сар, 2000) илуструје и налаз популације ларвица пре третмана која је показала значајне варијације у генеричком саставу између испитиваних група, упркос томе што су овце напасане заједно на истом пашњаку током пашне сезоне. Овакаву разлику су забележили и Miller и сарадници (2006), уз напомену да то додатно отежава како интерпретацију FECRT тако и дијагностику стронгилидозе у ширем смислу.

Као најчешћи разлози за настанак и ширење резистенције се помињу уношење резистентних паразита са новонабављеним овцама (уз изостанак прегледа и ефикасног третмана у карантину) или код напасања више запата на једном пашњаку, величина стада, висока фреквенција дехелминтизације, субдозирање, континуирана примена истих класа лекова, недостатак пријемчиве популације стронгилида (тзв. „refugia“) у време третирања итд. (Falzon и сар, 2014; Jackson и Коор, 2000; Silvestre и сар, 2002; Sutherland и Scott, 2010; Sargison, 2012).

Стадо оваца на испитиваном имању се полако увећавало од сопственог подмлатка и није било куповине нових приплодних оваца потенцијално заражених резистентним стронгилидама. Изузетак су приплодни овнови, који су набављани из различитих извора, али се они углавном не напасају. С друге стране, на имању су пасле овце других власника у три наврата. У свим случајевима, овце су биле непознатог паразитолошког статуса и без података о дехелминтизацији, тако да није могуће искључити да је присуство резистентних паразита последица овакве праксе. У литератури има доста података да је могуће заједно са увезеним овцама и козама унети и изолате желудачно-цревних стронгилида резистентне на антихелминтике (Varady и сар, 1993; Himonas и

Papadopoulos, 1994; Schnyder и сар, 2005; Artho и сар, 2007; Chaka и Gizaw, 2009; Voigt и сар, 2012). Напасање оваца различитих произвођача (и порекла) је у многим земљама (укључујући и нашу) уобичајена пракса, иако може да доведе до ширења резистенције у запатима (Silvestre и сар, 2002; Artho и сар, 2007). Третирање новопридошлих животиња (у карантину) ефикасним антихелминтиком је зато веома пожељно да се спречи контаминација околине јајима резистентних паразита (Leathwick и Besier, 2014).

Произвођачи су веома склони лошој процени телесне масе оваца. Она се углавном заснива на визуелном оцењивању (Besier и Hopkins, 1988; Theodoropoulos и сар, 2000; Pedreira и сар, 2006; Čerňanská и сар, 2008), што води у субдозирање оваца и последично до могућег развоја резистенције. Ипак, мало је вероватно да се ово догодило и на посматраном имању. Мерењем оваца помоћу сточне ваге пре апликације лекова током испитивања различитих препарата је установљено да се њихова просечна тежина креће углавном од 46,6 до 56,7 кг, док је најтежа овца имала 68 кг (резултати нису приказани). Практика на имању је да доза ивермектина приликом дехелминтизације одраслих оваца износи 1,5 мл по животињи што одговара телесној маси од 75 кг, која није забележена код пашних оваца у испитиваном запату. Abbott и сарадници (2009) препоручују да се током супкутане апликације ињекционих препарата овцама обрати пажња на правилно пласирање игле (да не дође до пробијања коже и просипања лека). После убризгавања, након извлачења игле је потребно притиснути место апликације да се спречи цурење лека. Познато је да се у пракси током дехелминтизације повремено догађа да део дозе апликоване поткожно заврши ван животиње, што је и део практичног искуства аутора. Минимална могућност да је дошло до субдозирања животиња ипак постоји, али је мало вероватно да је допринела развоју резистенције на ивермектин на имању. У томе иде прилог тврдња Silvestre и сарадника (2002) да би тек дуготрајна континуирана апликација (прецизних) суптерапеутских доза целом запату допринела селекцији резистентних алела, што се највероватније не догађа у стварности. Према овим ауторима, субдозирање је пре повремено него стални фактор у настанку резистенције на антихелминтике.

Макроциклични лактони су класа антихелминтика која се двадесет година без прекида и без годишње ротације са другим класама користила за сузбијање желудачно-цревних стронгилида оваца на имању. Ивермектин је најчешће коришћен лек (Табела 6), чак седамнаест година самостално (првих петнаест година у континуитету). Понекад је апликован у терапији дела запата уз дорамектин који припада истој класи антихелминтика, а ретко је примењивана ротација различитих активних супстанци код третмана целог запата у току једне сезоне. У литератури је такође забележено да произвођачи континуирано примењују једну класу лекова (Theodoropoulos и сар, 2000). Судећи по резултатима FECR тестова, континуирана примена макроцикличних лактона није прошла без последица по ефикасност ивермектина против локалне популације желудачно-цревних стронгилида оваца, што је у складу са наводима из литературе (Silvestre и сар, 2002; Vadlejch и сар, 2014). Иако је последњих година у дехелминтизацији повремено коришћен и дорамектин чија је ефикасност на фарми била добра (Лалошевић и Симин, 2008), то очигледно није успорило пад ефикасности макроцикличних лактона, с обзиром на то да постоји могућност развоја узгредне резистенције између ове две активне супстанце (Echevarria и сар, 1997; цитирани у Murphy, 2001), као и између других лекова из ове класе (нпр. Paraud и сар, 2016). Постоје извештаји о резистенцији стронгилида оваца на дорамектин у Швајцарској и Холандији (Artho и

сар, 2007; Borgsteede и сар, 2007). Због могућности развоја узгредне резистенције, ефикасност дорамектина на имању можда више није на високом нивоу, што би требало поново проверити.

Дехелминтизација оваца на испитиваном имању није често спровођена. У просеку је било око 2 третмана годишње (1,91 уз распон од 1-3 пута), слично као у Грчкој (Theodoropoulos и сар, 2000), Шпанији (Pedreira и сар, 2006), Словачкој (Čerňanská и сар, 2008) и Ирскеј (Patten и сар, 2011). У Шкотској и Француској је забележено да се овце чешће дехелминтишу на годишњем нивоу: у просеку 2,7 односно 3,5 пута (Bartley и сар, 2003; Chartier и сар, 1998). Интензивна примена антихелминтика код оваца неизоставно води у настанак односно прогресију резистенције (Barton, 1983; Kenyon и сар, 2013), нарочито када се третирају све овце и не оставља довољно осетљивих паразита који су „избегли“ третман да разреде резистенцију (тзв. „refugia“ - Martin и сар, 1981; Van Wyk, 2001; Besier, 2012). С обзиром на то да на имању није било хемиопрофилактичке супресије паразита, мало је вероватно да је учесталост примене антихелминтика узрок настанка резистенције. Разлог за ову појаву треба потражити у терапијском приступу (моменат примене лекова током сезоне и број третираних оваца) као и у пракси напасања и узгоја на имању, јер су то фактори који могу утицати на величину осетљиве популације паразита и смањену ефикасност лекова (Silvestre и сар, 2002). Стратешки третман оваца у пролеће и јесен је део стандардне хемиопрофилактике, и спроводи се рутински како код нас тако и у другим земљама (Цветковић, 1976; Шибалић и Цветковић, 1996; Silvestre и сар, 2002; Pedreira и сар, 2006; Čerňanská и сар, 2008). На имању је у почетку примењивана препоручена шема третмана у пролеће и јесен, међутим после дужег периода број третмана у јесен се смањио у корист летњих дехелминтизација. Имајући у виду копролошке налазе (Графикон 8) где је током лета већи број јаја него у пролеће и јесен и када је повећан ризик од хемонхозе, промена времена терапије је оправдана, мада је учесталост третмана могла бити и већа с обзиром на ризик. Из историје дехелминтизације се може видети када су овце третиране антихелминтицима током пашне сезоне. Сумирањем података по годишњим добима (за период 2005-2014), следи да је највише третмана било у лето (9х) и пролеће (7х) а најмање у јесен (3х), док у зимском периоду није било дехелминтизације. Након третмана у пролеће и јесен, врста (у овом случају из рода *Trichostrongylus*) која преживи и размножава се у овцама, има на располагању повољне климатске услове да се развија на пашњаку, што доводи до реинфекције резистентним изолатом. Међутим, то тада није толики проблем јер се једнако добро развијају и преживљавају и изолати осетљиви на ивермектин.

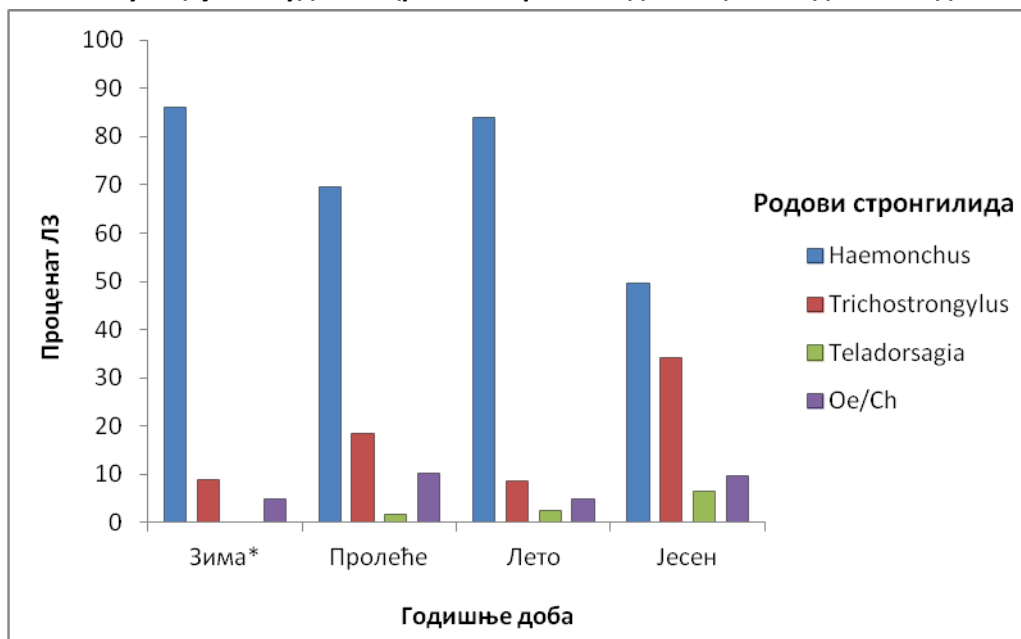
Током лета су температуре највише, па су у повољним годинама које имају доста падавина развој и реинфекција стронгилидама још бржи. У топлим и сушним годинама са великим бројем тропских дана је микроклима на пашњаку неповољна и то се негативно одражава на преживљавање ЛЗ са једне стране, и на раст траве на пашњаку са друге стране. Велика концентрација оваца на пашњаку, као што је овде случај, због недовољне количине биомасе приморава животиње да пасу траву ближе земљи и тако унесу више инфективних ларвица. Осим тога, недостатак хранљивих материја слаби способност организма да се избори против јаче инвазије. Мање биомасе доводи и до повећања морталитета ЛЗ на пашњаку због одсуства заштите од УВ зрачења (van Dijk и сар, 2009), што је важно због тога јер угињавају ЛЗ осетљивих генотипова чија је најважнија улога да разреде резистентне паразите који су преживели третман и налазе се у овцама свакодневно контаминирајући пашњак. Повећање броја резистентних ЛЗ на пашњаку

доводи до акумулирања у овцама што се, кад пређе критичну границу, негативно одражава на производњу услед смањења ефикасности лека који не може да елиминише претњу.

Многи аутори су доказали да је управо величина осетљиве популације на примењивани антихелминтик („refugia“) у моменту његове примене управо један од најважнијих фактора који ће утицати на брзину развоја резистенције у некој популацији желудачно-цревних стронгилида оваца (Van Wyk , 2001; Waghorn и сар, 2008; Besier, 2012).

У случају испитиваног имања где је резистентан род *Trichostrongylus*, разлози за настанак резистенције су последица комплексне интеракције између (одсуства) ротације и времена апликације антихелминтика, броја третираних оваца, броја присутних паразита у овцама и на пашњаку у време третмана, величине пашњака, локалних услова спољашње средине (променљивих од сезоне до сезоне) који утичу на развој и преживљавање слободноживећих стадијума стронгилида осетљивих или резистентних на ивермектин и, коначно, степена инвазије и пријемчивости/отпорности оваца. Веза између сезонске динамике резистентног *Trichostrongylus*-а (али и осталих врста желудачно-цревних стронгилида на имању), локалне микроклиме на пашњаку (диктиране пре свега колебањем у температури и падавинама) и временом апликације антихелминтика се боље илуструје посматрањем графикана 10 и 15. Недостатак довољне пропорције ларвица *Trichostrongylus*-а осетљивих на ИВМ у појединим периодима његове примене током свих година је, уз одсуство ротације антихелминтика, највероватнији узрок појаве резистенције на испитиваном имању.

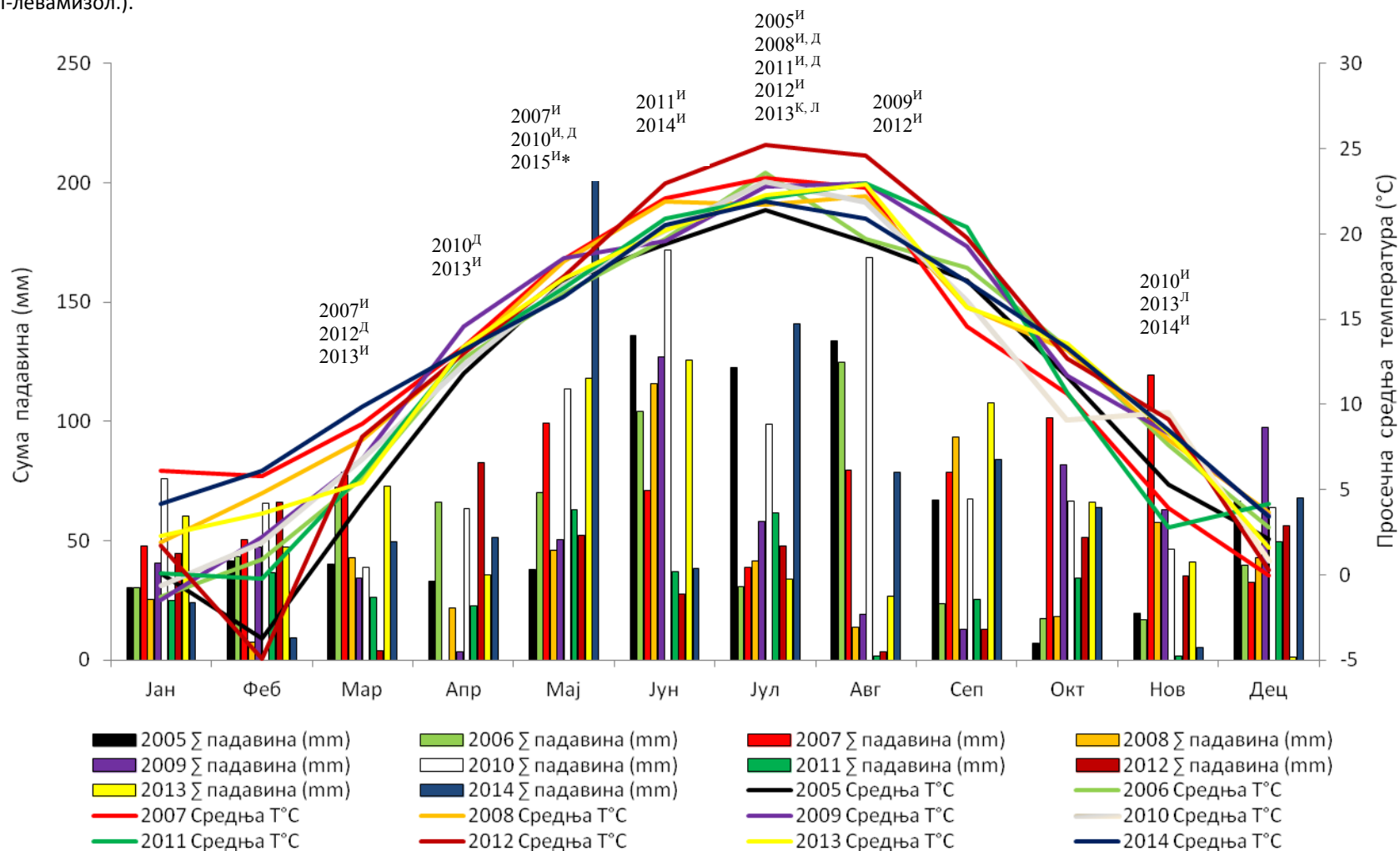
Графикон 10. Популација желудачно-цревних стронгилида оваца по годишњим добима.



6.2.2. Ефикасност против *Nematodirus* spp.

Nematodirus врсте су слабо плодне и продукују веома мали број јаја (McKenna, 1981). Поред тога, негативан копролошки налаз не искључује присуство паразита у цревима, који могу достићи ниво и до 11.000 јединки (резистентних у овом случају, Chalmers, 1985). Такође, постоји старосна резистенција оваца према инвазији паразитима из овог рода (Петровић и сар, 1960). Знајући да је минимум 50 јпг потребно да би род био адекватно заступљен за FECRT (McKenna, 1995), горенаведене чињенице јасно илуструју да може бити тешко достићи чак и тај број јаја *Nematodirus*-а код одраслих имунокомпетентних оваца. Примера ради, у огледима на посматраном имању је у јулу 2012. године на дан апликације ИВМ, 5 од 11 позитивних оваца имало више од 50 јпг *Nematodirus* spp. у огледној групи, а само 3 од 7 позитивних у контролној групи, што није било довољно за извођење FECRT. При томе је важно истаћи да су управо две овце са бројем јаја од 10 и 30 јпг пре третмана имале 60 и 110 јпг после третмана, тим редом, док је већина оваца са више од 50 јпг била негативна (Табела 13).

Графикон 15. Укупна количина падавина и просечна температура по месецима за станицу Римски Шанчеви у периоду од 2005-2014; датум третмана оваца по месецима и годинама уз назнаку који је антихелминтик коришћен. (Д-дорамектин; И-ивермектин; К-клозантел; Л-левализол.).



*климатски подаци нису приказани за 2015. годину.

Да би се проверила ефикасност ИВМ против *Nematodirus* spp. на имању, постојала је могућност извођења скупог контролног теста ефикасности заражавањем и клањем третиране јагњади, као што је урадила једна група аутора (Middelberg и McKenna, 1983; Morrison et al, 2014; Whelan et al, 1995), или периодични копролошки преглед док број јаја не буде задовољавајући што је у складу са протоколима других аутора (Beveridge et al, 1990; Little et al, 2010). Beveridge и сарадници (1990) су 18 месеци пратили ниво јаја на једној фарми оваца у јужној Аустралији да би достигли потребан ниво за FECRT, и при том дијагностиковали резистенцију на бензимидазоле баш на том имању. На основу својих резултата, истакли су да перзистентно низак ниво јаја не значи нужно да резистенције нема.

Испитивање ефикасности ИВМ против *Nematodirus* spp. је урађено FECRT по протоколу који су користили Bentounsi и сарадници (2007) где је довољно да овца само буде копролошки позитивна. Овце третиране двократно у размаку од 10 дана (што је важно имајући у виду ову дозно-лимитирајућу врсту), а јаја су бројана 20-ог дана (уместо 14-ог). Ниво јаја у третираној групи на „дан 0“ је износио просечно око 93 јпг (распон 30-150; само две од 14 оваца су имале мање од 50 јпг) и био је много виши од распона 4-65 јпг који су забележили Bentounsi и сарадници (2007). Hughes и сарадници (2005) су имали виши почетни ниво јаја од 70 јпг, док су Kenyon и сарадници (2016) у испитивању ефикасности различитих антихелминтика забележили почетне нивое и мање (просек 39,3 јпг за бројање Mini-FLOTAC-ом) и много веће (просек 343,5 јпг за бројање Mini-FLOTAC-ом) од нивоа у овом истраживању.

После двократног третмана, установљено је да ефикасност ивермектина против популације *Nematodirus* spp. присутне на имању није била оптимална јер је редукција јаја износила 74%. Резултати FECRT, који је заправо прво испитивање ефикасности ИВМ против овог рода у Србији, представљају уједно и први налаз резистенције *Nematodirus* spp. на ивермектин у нашој земљи. Постоји мноштво публикација у светској литератури са извештајима о налазу резистенције на антихелминтике код различитих врста из рода *Nematodirus*. Углавном се то односи на бензимидазоле (Beveridge и сар, 1990; Chalmers, 1985; Obendorf и сар, 1986; Obendorf и сар, 1991; Bentounsi и сар, 2007; Little и сар, 2010; Middelberg и McKenna, 1983; Martin и сар, 1985; Mitchell и сар, 2011; Morrison и сар, 2014; Waghorn и сар, 2006; Oliver и сар, 2016) и левамизол (Middelberg и McKenna, 1983; Edwards и сар, 1986; Little и сар, 2010; Waghorn и сар, 2006) па и њихову комбинацију (Waghorn и сар, 2006), али је број публикација где се помињу макроциклични лактони веома мали (Waghorn и сар, 2006; Bentounsi и сар, 2007).

Разлог за ово може бити чињеница да су врсте из рода *Nematodirus* (и *Cooperia*) познате као дозно-лимитирајуће на макроцикличне лактоне (Bogan и McKellar, 1988; Vercruysse и Rew, 2002; Riviere и Papich, 2009). У истраживањима приликом титрације дозе ИВМ у огледима приликом регистрације лека, ефикасност је варијала против различитих *Nematodirus* врста (Campbell, 1989). Тако је доза од 200 µg/kg (0,2 mg/kg) ТМ примењена s/c код говеда елиминисала 99% *Nematodirus spathiger* а само 84% *Nematodirus helvetianus*. Примењен p/o, ИВМ је у истој дози довео до редукције 97% *Nematodirus helvetianus* код говеда (и 98% ларвених облика). У оваца, наведена доза примењена p/o успешно елиминише 99% *Nematodirus battus* и *Nematodirus filicollis*, односно 98% *Nematodirus spathiger* (и 98-99% ларвених облика за све врсте). Супкутана формулација је била мање ефикасна против *Nematodirus filicollis* (свега 92% одрасли и 93%

ларвени облици) и *Nematodirus spathiger* (95% против ларвених облика; против одраслих није испитана) у односу на *p/o*.

Доза од 0,2 mg/kg ТМ је потребна да би елиминисала дозно-лимитирајуће врсте и да би ивермектин постигао свој пун антипаразитски спектар (Riviere и Papich, 2009). Према Geary-ју и сарадницима (2012), дозно-лимитирајуће врсте могу да буду осетљиве на селекцију на АР, и у најмање неколико прилика је резистенција прво откривена управо код њих, на пример у случају паразита говеда (*Cooperia* spp.) контролисаних МЛ. Уобичајене дозе антихелминтика које се користе у пракси су заправо и калибрисане према дозно-лимитирајућим врстама, и више су од доза потребних да елиминишу >95% *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp. и *Trichostrongylus axei* које износе 0,05 mg/kg ТМ (Bogan и McKellar, 1988; Coles и сар, 2006), тако да се рана дијагноза АР у теренским условима спроводи употребом пола дозе ИВМ 0,1 mg/kg ТМ (Coles и сар, 2006) која је у иницијалним испитивањима ИВМ показала ефикасност >98% против најважнијих стронгилида оваца (Chabala и сар, 1980).

Рана дијагноза резистенције применом пола дозе ИВМ је спроведена у неколико наврата на Новом Зеланду. Hughes и сарадници (2005) су за *Nematodirus* spp. укључили само једну фарму која је имала потребни ниво јпг на „дан 0“ и установили редукцију од 93%. Две године касније, број фарми са адекватним бројем јаја је био 13, а субоптимална редукција јаја (<95%) је забележена на 3 (23%) фарме (Hughes и сар, 2007). Waghorn и сарадници (2006) су довољно јаја *Nematodirus* spp. пронашли на 27 фарми, а ефикасност мању од 95% на 13 (48%) фарми, уз распон редукције јаја од приближно 33-92%. Исти аутори су применом пуне дозе ИВМ против *Nematodirus* spp. само на две (7%) фарме пронашли недовољну ефикасност у нивоу од око 90 односно 94% (Waghorn и сар, 2006). У Алжиру, применом двократне пуне дозе инјекционог ИВМ у размаку од 10 дана, забележена је резистенција *Nematodirus* spp. на три фарме од девет тестираних, али није наведено колики је проценат редукције јаја (Bentounsi и сар, 2007). У скорашњем истраживању у Чешкој су пронађене ларве *Nematodirus* spp. у копрокултурама након апликације ивермектина и моксидектина (Vadlejch и сар, 2014). Иако није забележена резистенција, налаз након третмана указује да постоје гени за резистенцију у популацији овог рода и да се промена осетљивости на МЛ може очекивати у будућности. У Шкотској је ефикасност ИВМ против *Nematodirus* spp. испитана на 4 фарме; на једној фарми је забележена сумња на резистенцију иако је ефикасност била 96,5% (био је низак доњи 95% ИП: 11,1) док је на осталима била преко 99% (Kenyon и сар, 2016). Други аутори су применом пуне дозе ивермектина забележили максималну ефикасност ивермектина против *Nematodirus* spp. (Rapić и сар, 1985; Whelan et al, 1995; Little и сар, 2010).

Разлике у ефикасности ИВМ против *Nematodirus* spp. могу бити последица примене различитих генеричких препарата. Пре дехелминтизације је потребно консултовати прескрипцију конкретног препарата, јер на пример у Беликој Британији се за неке од препарата ИВМ не наводи да делују против свих *Nematodirus* врста (Eric R. Morgan, лична комуникација). У прескрипцији препарата Ivermectin-S® ограничења против појединих *Nematodirus* врста нису наведена. Према упутству, лек делује против свих облика *Nematodirus* spp. (одрасли и ларве четвртог стадијума) за разлику од родова *Trichostrongylus* и *Oesophagostomum* и врсте *Trichuris ovis* где је напоменуто дејство само против одраслих облика.

Узимајући у обзир да је у литератури забележена добра ефикасност ивермектина против *Nematodirus* spp., да је коришћен препарат који је пријављен да делује против паразита из овог рода и да је препарат свакој овци појединачно два пута апликован у пуној дози на основу телесне масе, може се закључити да слаба ефикасност ивермектина против *Nematodirus* spp. представља праву резистенцију а не толеранцију на овај лек, што је у складу са налазима Bentounsi и сарадника (2007). Утврђено је да су код оваца на имању присутне три врсте *Nematodirus* spp. (*N. spathiger*, *N. filicollis* и *N. abnormalis*), али није познат њихов међусобни однос и процентуална заступљеност у животињама. Врсте које су преживеле третман ИВМ такође нису утврђене, и могуће је да је само једна од три резистентна на лек или да доминира у налазу после третмана. У појединим истраживањима, *N. spathiger* је врста која је показала већи степен резистенције на бензимидазоле у односу на друге врсте (*N. filicollis* и *N. abnormalis*, Beveridge и сар, 1990; *N. filicollis*, Oliver и сар, 2016). Потребна су додатна истраживања да би се утврдило која од врста *Nematodirus* spp. које паразитирају у овцама на испитиваном имању је резистентна на терапију ивермектином.

6.3. Карактеристике нематофагне гљиве *Duddingtonia flagrans* MUCCL 9827

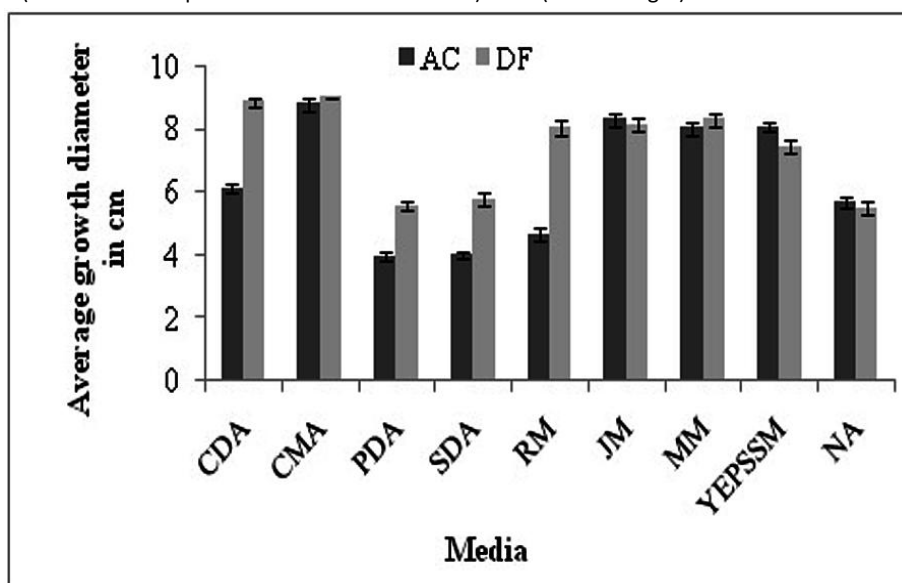
Опис различитих морфолошких структура изолата *D. flagrans* MUCCL 9827 (хифа, хламидоспора, конидиофора, конидија и тродимензионалних замки) је у складу са првобитним описом изолата (Duddington, 1949). Морфометрија свих наведених структура такође одговара вредностима које је дао Duddington, једино је ширина конидије мања од првобитно описане (8 наспрам 14-16 μm). Поређењем добијеног налаза са објављеним описима разних изолата *D. flagrans* других аутора, евидентирано је да морфолошки углавном одговара типском опису врсте, а да постоје извесна одступања у величини различитих структура, пре свега конидија, конидиофора и хламидоспора. Узимајући у обзир морфометријске варијације, вредности добијене у овом истраживању се слажу са објављеним описима гљиве (Cooke, 1969; Chandrawathani и сар, 2002; Skipp и сар, 2002; Shams Ghahfarokhi и сар, 2004; Wang и сар, 2015). Генетска разноврсност различитих изолата *D. flagrans* је веома мала, и постоји могућност да они потичу од истог претка, и да су раширени на друге континенте (Азија и Аустралија) извозом стоке (Wang и сар, 2015). Велика морфолошка и морфометријска сличност различитих изолата може да буде управо последица високе генетске сродности.

У овом истраживању, раст *D. flagrans* MUCCL 9827 је испитиван на PDA (кромпир-декстроза) агару и гладном агару. Установљено је да изолат брзо прераста кромпиров агар, док је раст на гладном агару у неким серијама описан као добар а у неким спор. У оригиналном истраживању Duddington-а (1949), ова гљива је изолована на кукурузном агару на коме је касније показала и добар раст. Такође, Duddington је забележио и добар раст на Чапековом (Czapek's) агару. Waller и Faedo (1993) су установили да овај изолат (под идентификационим бројем CBS 565.50- види Табелу 3) расте и на другим хранљивим подлогама попут ATCC 196 (yeast malt extract agar), МА (2% malt agar), СМА (0,6% corn meal agar) на којој расте брзо прекривајући више од 80% Петри кутије пречника 8 цм за 7 дана; и FA (sheep faecal agar). Den Belder и Jansen (1994) нису приказали резултате раста овог изолата на кукурузном агару. Boguš и сарадници (2005) су, уз још четири

друга, испитивали раст овог изолата *D. flagrans* (CBS 565.50 = MUCL 9827) на две течне (LB (Luria broth) и MM (minimal medium)) и четири чврсте подлоге (CMA; SAB-Sabouraud agar; SAB-GM (суплемент: екстракт ларве инсекта *Galleria mellonella*) и SAB-HP (суплемент: екстракт ларве нематода миша *Heligmosomoides polygyrus*)), постављене на различитим температурама. Што се тиче раста на течним подлогама, *D. flagrans* MUCL 9827 боље расте на медијуму богатијем у (LB) него на медијуму сиромашном у нутријентима (MM). У поређењу са другим чврстим подлогама, колоније на CMA су расле веома слабо. Најбржи раст је забележен на SAB-HP, а најспорији на CMA.

Када је у питању раст на PDA агару (и на гладном агару засејаном са 500 хламидоспора), налази се не могу директно поредити са другим резултатима јер су хламидоспоре равномерно раширене по подлози и није мерена брзина раста изражена у јединици дужине по јединици времена, па се опис раста речима „брз“ и/или „добар“, иако тачан у датим околностима мора узети са извесном резервом. У датим условима култивације дошло је до прерастања целе површине стандардне Петри плоче после 5 дана на температури од 25°C. У другим публикацијама нема детаљног описа динамике раста *D. flagrans* на овој подлози; описан је кратко. Shams Ghahfarokhi и сарадници (2004) су пратили раст изолата CBS 583.91 при истој температури од 25°C који је порастао 45 mm након три недеље (или око 2,14 mm дневно). Pandit (2014) је у истраживању динамике раста индијског изолата *D. flagrans* RPAN10 означио PDA агар као медијум на коме овај изолат споро расте, уз још две подлоге (SDA (Sabouraud dextrose agar) и NA (Nutrient agar)). Најбољи раст је овај изолат показао на CMA за којим је следило још неколико подлога (Графикон 16).

Графикон 16. Раст индијског изолата *D. flagrans* RPAN10 на различитим хранљивим подлогама (Pandit 2014). Приказани су хистограми који означавају раст у cm (скала лево) две врсте гљива: *Arthrobotrys conoides* (AC) и *D. flagrans* (DF). Скраћенице се односе на називе подлога: CDA (Czappek Dox Agar), CMA (Corn Meal Agar), PDA (Potato Dextrose Agar), SDA (Sabouraud dextrose agar), RM (Remington's Medium), JM (Jenson's Medium), MM (Martinson's Medium), YEPSSM (Yeast Extract Peptone Soluble Starch Medium) и NA (Nutrient agar).



Кукурузни агар (СМА) је медијум на коме је најчешће узгајана *D. flagrans*, те је најлакше поредити динамику раста различитих изолата. У истраживању Morgan-а и сарадника (1997), максималан дневни раст *D. flagrans* на СМА је био 15 mm на температури између 25-33°C (испитан температурни опсег 7-37°C; није наведен изолат). Sanyal (2000) наводи да је индијски изолат растао најбоље на 25°C (око 60 mm за 5 дана или 12 mm дневно). Pandit (2014) бележи 25-28°C као оптималну температуру изолата *D. flagrans* RPAN10 уз раст колонија од 90 mm (време није прецизирано, нажалост). Бољи раст на кукурузном у односу на фекални агар карактерише и неколико данских изолата (Fernández и сар, 1999). Постојале су разлике у брзини раста између различитих изолата на истим подлогама, али и између истих изолата на различитим константним температурама. Најбржи раст на СМА је показао изолат CIII2a који је на 20°C за девет дана нарастао преко 70 mm (или око 8 mm дневно; раст на нижим температурама од 10 и 15°C је био знатно спорији). У поређењу са тим, изолат *D. flagrans* MUCL 9827 је у истим условима за исто време нарастао само око 5-6 mm, док неки други изолати, попут MUCL 28429 и CBS 583.91, у том периоду уопште нису расли на овој подлози (Boguś и сар, 2005). Повећање температуре на 30°C је имало за последицу убрзање раста *D. flagrans* MUCL 9827 и MUCL 28429 на кукурузном агару у укупном периоду посматрања од 21 дан, док је раст других изолата ова температура успорила (CBS 583.91 и CBS 143.83) или потпуно инхибирала (CBS 561.92). На Sabouraud (са и без суплемената), *D. flagrans* MUCL 9827 је расла слично (на 20°C) или нешто спорије (на 30°C) у поређењу са осталим изолатима (Boguś и сар, 2005).

Што се тиче морфологије мицелијума на гладном агару, *D. flagrans* MUCL 9827 формира ретке беличасте колоније, које су такође тако описане и за друге изолате (*D. flagrans* CBS 583.91; Shams Ghahfarokhi и сар, 2004, малезијски изолат; Chandrawathani и сар, 2002. и мексички изолат *D. flagrans* FTНО-8; Gonzales Garduno и сар, 2005). Након убацивања дискова са седмодневном културом гљиве на 2% гладни агар и инкубацију на 25°C током 10 дана, изолат *D. flagrans* MUCL 9827 је карактерисао веома спор раст од 1,7-2 mm дневно. Ни после 10 дана мицелијум није стигао до ивица Петри кутије и износио је 17-18 mm од ивице засејаног диска. Имајући у виду да су горенаведени подаци других аутора добијени испитивањем раста различитих изолата на СМА, подлогом богатом у нутријентима, не изненађује чињеница да је *D. flagrans* MUCL 9827 расла тако споро на сиромашном медијуму попут гладног агара. Међутим, Grønvold и сарадници (1996) су испитали раст 3 данска изолата на нутријентима сиромашној подлози - разређеном СМА агару (1:10) и установили добар раст на 25°C (око 37-44 mm за седам дана или 5,29-6,29 mm дневно), а још бољи раст на 30°C (око 42-56,9 mm за седам дана или 6-8,13 mm дневно). При томе *D. flagrans* C13 је расла најбрже, за њом је следила *D. flagrans* Troll A а најспорија је била *D. flagrans* CIII4, на обе температуре. У поређењу са овим подацима, види се да изолат *D. flagrans* MUCL 9827 расте спорије у односу на друге изолате *in vitro*, што је у складу са запажањима Boguś и сарадника (2005).

Формирање хламидоспора *D. flagrans* MUCL 9827 на кромпировом агару је примећено након 48 сати и то се наставило током раста културе. Познато је да на површинским културама *D. flagrans* формира хламидоспоре након три дана (Anan'ko и Terpyakova, 2011), те је добијено запажање везано за испитивани изолат гљиве у складу са литературним подацима.

D. flagrans MUCL 9827 је расла на два нивоа pH на PDA агару (6 и 9). Оптималан pH за раст ове гљиве на хранљивим подлогама се креће у вредностима pH=5,5-8 при чему је максималан

раст на pH=7 (Braga и сар, 2013; Gardner и сар, 2000; Pandit, 2014), а ова врста расте и на већим вредностима pH (до 10,5; Gardner и сар, 2000) што ову врсту чини алкалотолерантном, како је и потврђено у овом истраживању.

Огледима на гладном агару је јасно доказана *in vitro* нематофагна активност изолата *D. flagrans* MUCL 9827 против L_3 желудачно-цревних стронгилида оваца. Тиме је потврђен налаз Duddington-а (1949) који је такође забележио нематофагну активност приликом изолације ове врсте гљиве. Поред фотографија L_3 ухваћених у замке у пределу главе, тела и/или репа, уочен је и раст трофичних хифа кроз тело ларвица и формирање хламидоспора унутар њих. То значи да је гљива користила ларве као извор хранљивих материја јер је доказано да се хламидоспоре унутар тела ларвице формирају након процеса дигестије (Wang и сар, 2015).

6.4. Испитивање *in vitro* ефекта изолата *D. flagrans* MUCL 9278 на желудачно-цревне стронгилиде оваца

Квантитативна процена способности изолата *D. flagrans* MUCL 9278 да у *in vitro* огледу на 2% гладном агару доведе до редукције L_3 желудачно-цревних стронгилида оваца је изостала због одсуства нематофагне активности у скоро свим репликатима. Због слабог раста, посматране су само кутије засејане са 500 и 1000 хламидоспора. Изолат је хватао L_3 само у једној Петри кутији засејаној са 1000 хламидоспора, а појава одсуства предаторства у осталим серијама, односно понављањима, је прво приписана налазу проређеног мицелијума и слабом расту овог изолата гљиве на датој подлози. С тим у вези, треба имати у виду да је раније наведено да *D. flagrans* иначе оскудно расте на 2% WA што није спречило друге изолате ове (нпр. Araujo и сар, 2010; Braga и сар, 2013; Braga и сар, 2013-nojevi; Campos и сар, 2009; Gonzales Garduno и сар, 2005; Sanyal, 2000) или сродног рода *Arthrobotrys* (нпр. Nansen и сар, 1986) да остваре значајан проценат редукције разних врсти ларвица у *in vitro* условима на истом медијуму.

Упркос томе што је показано да MUCL 9278 расте спорије у датим *in vitro* условима у односу на друге изолате, то не значи да мора нужно имати слабију предаторску активност. Забележено је да дански изолати *D. flagrans* који су показали бржи раст на подлогама нису остварили подједнако добре резултате у хватању ларви нематода (Fernández и сар, 1999). Такође, ни густина раста хифа неког изолата нематофагних гљива не одређује његову предаторску активност, што је доказано на примеру три изолата *Arthrobotrys oligospora* (Den Belder и Jansen, 1994). Предаторска активност је пре свега условљена способношћу изолата да развије замке као и бројем развијених замки по јединици површине. Већина аутора тврди да *D. flagrans* производи замке само када је стимулисана на то (Rosenzweig, 1984; Den Belder и Jansen, 1994; Boguś и сар, 2005; Anan'ko и Терпљакова, 2011). Насупрот томе, Arias и сарадници (2013) су запазили спонтани развој замки мексичког изолата FTHO-8 после 5 дана на кукурузном агару. Према Wang-у и сарадницима (2015), *D. flagrans* може спонтано да развија замке када се изолат често пасажира и стимулише ларвицама нематода, што није рађено у случају огледа са изолатом *D. flagrans* MUCL 9278.

Контакт са живим, добро покретним ларвицама нематода је веома важан стимулус за развој замки *D. flagrans* (Grønvald и сар, 1996; Morgan и сар, 1997). Међутим, у скорошњој студији

је доказано да и мртви хелминти (*Trematoda* и *Nematoda*) као и њихови секреторни производи такође стимулишу продукцију замки (Arias и сар, 2013). И код филогенетски блиске врсте *A. oligospora*, трансформација из сапрофитске у предаторску фазу се дешава након стимулације не само живим нематодама него и другим земљишним животињским организмима (глисте, ларве инсеката) или након додавања одређених пептида (укључујући и пептиде нематода) (Nordbring-Hertz, 1977).

Анан'ко и Терпљакова (2011) су закључили да постоје два важна предуслова за развој замки *D. flagrans*. Прво, концентрација угљеника и азота у медијуму мора да буде испод одређеног нивоа да би дошло до нутритивног стреса, а друго треба да дође до стимулације мицелијума екскретима нематода али се то може учинити и одређеним концентрацијама аминокиселина на које је гљива посебно осетљива. На подлогама богатим хранљивим материјама, где нема нутритивног стреса за колонију, гљива развија мањи број замки за хватање нематода (Morgan и сар, 1997; Gonzales Garduno и сар, 2005). Rosenzweig (1984) је забележио да упркос добром расту *D. flagrans* није спонтано развијала замке ни на нутритивно сиромашним нити богатим подлогама, чак ни уз додаток различитих аминокиселина и пептида. Једино након додатка нематода *Panagrellus silusiae*, замке су се развиле у року од 24-48 сати. Слично, у култури *D. flagrans* (изолати AC001 и CG722) присуство ларви малих стронгилида коња је било од суштинске важности за формирање замки на гладном агару, јер је овај медијум сиромашан у хранљивим материјама (Braga и сар, 2011). Подлоге сиромашне нутријентима (попут гладног агара) су погодне за стимулацију развоја замки, јер нематофагне гљиве користе способност храњења животињским организмима само када су изложене нутритивном стресу (Nordbring-Hertz, 1968). Међутим, изгледа да само присуство ларвица нематода у културама није једини стимулус за развој нематофагних структура. Nordbring-Hertz (1977) тврди да на развој замки снажно утичу фактори средине попут нивоа хранљивих материја, температуре, влаге, pH, светлости, нивоа O₂/CO₂.

Узимајући све у обзир, било је реално очекивати појаву нематофагне активности изолата *D. flagrans* MUCL 9827 на храном оскудном гладном агару нарочито после додавања довољно ларвица нематода које су биле добре покретљивости. Све серије култура су постављене на исти начин (иста врста подлоге, pH), држане у термостату под истим условима (температура, светлост, ниво O₂/CO₂) и стимулисане истим бројем и врстама ларвица. И поред тога, чини се да су у само једној од шест Петри кутија са развијеним мицелијумом комплексни фактори који утичу на развој замки били оптимални. Нематофагна активност је забележена само у Петри кутији са 1000 спора, што сугерише да је у другим било довољно хране за колоније и да је само у тој једној култури ниво стреса достигао критичну тачку да гљива пређе у предаторску фазу. Boguš и сарадници (2005) су такође забележили одсуство развоја замки пет изолата *D. flagrans* (укључујући и MUCL 9827) јер је, како су закључили, постојала довољна концентрација доступног угљеника и азота који је спречио прелаз *D. flagrans* из сапрофитске у предаторску фазу на медијумима нормално дефицитарним у хранљивим материјама. У овом истраживању, у серијама са дисковима, могуће је да је мицелијум, осим из гладног агара, узимао храну и из самог диска (комадић PDA). У серијама где је додато 500 хламидоспора, култура вероватно није потрошила сав извор хране из подлоге за посматрани временски период, имајући у виду брзину раста овог изолата. Хиљаду додатих хламидоспора је само у једној Петри кутији достигло критични ниво стреса, и дошло је до преласка из сапрофитске у предаторску фазу, а у друге две је ово изостало. Анан'ко и Терпљакова (2011) наводе да се у

агаризованим медијумима, на којима се најчешће врше *in vitro* огледи са нематофагним гљивама, састав нутријената и биолошки активних једињења разликује на појединим деловима површине. Осим тога, старост и физиолошка зрелост мицелијума културе показује значајну хетерогеност. Резултати квантитативних истраживања физиологије нематофагних гљива су стога често непрецизни и варирају између различитих студија. То значи да је могуће да су се, у испитивању активности изолата *D. flagrans* MUCL 9827 замке развиле на месту клијања спора након инокулације на 2% WA (тамо где је колонија најстарија) или је баш на месту развоја замки количина хранљивих материја у агару била најмања.

Забележена је и нејасна нематофагна активност где није било развијених замки а поједине ЛЗ су биле ухваћене у региону репа. Постоје подаци да поједини изолати сродних нематофагних гљива које типично развијају замке могу хватати нематодe и помоћу адхезивних хифа (изолат *Arthrobotrys oligospora* CBS 289.82; Den Belder и Jansen, 1994), док нема података у доступној литератури да се овако понаша и *D. flagrans*.

In vitro активност појединих изолата нематофагних гљива на агару не даје јаке индикације предаторског капацитета у природном окружењу, што је илустровано на примеру изолата *Dactyella candida* 023 и *Arthrobotrys dactyloides* A4 које су показале веома слабу нематофагну активност на кукурузном агару у односу на земљиште, за разлику од M2 изолата *A. oligospora* који је деловао супротно (Galper и сар, 1995). У овом делу *in vitro* истраживања изолат *D. flagrans* MUCL 9827 је испољио слабу предаторску активност против ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца на гладном агару. Способност да редукује ларвице у измету оваца након додавања различитих доза хламидоспора у односу на број јаја стронгилида је испитана тестом копрокултуре.

Провером присуства нематофагних гљива у 11 узорак свежег измета оваца пре почетка теста копрокултуре није пронађен позитиван узорак. За изолацију нематофагних гљива ради њихове употребе у биолошкој контроли нематода домаћих животиња пожељан извор је свежи измет, јер су оне тада већ прошле кроз ГИТ што доказује да се могу употребљавати *in vivo* (Kelly и сар, 2009). Будући да је пашњак са околином (земљиште, живи и неживи биљни покривач) микростаниште на којем нематофагне гљиве сигурно расту, овце које имају способност да пасу траву до саме површине земљишта представљају добар избор за проналажење теренских изолата гљива, пре него друге пашне животиње које брсте, попут коза (Manueli и сар, 1999). Ипак, значајно је нагласити да је вероватноћа да пашне животиње поједу нематофагне гљиве које ће преживети пасажу кроз ГИТ веома мала. Ако се то и догоди, животиње их поједу периодично и то у веома малим количинама, што отежава њихову изолацију због незнатног броја спора које прођу кроз ГИТ (Larsen и сар, 1994; Manueli и сар, 1999). Слично као у овој студији, ни Shams Ghahfarokhi и сарадници (2004) у Ирану нису успели да изолују ниједну нематофагну гљиву у 138 свежих узорак измета узетих директно из ректума оваца, користећи исту подлогу и приближан број Л₃ *Haemonchus contortus*. Насупрот оваквим налазима, свежи измет оваца може да буде колонизован нематофагним гљивама у различитом проценту. На пример, Manueli и сарадници (1999) су прегледајући 2009 узорак пронашли свега 1,1% позитивних на гљиве (већина из рода *Arthrobotrys*). У Аустралији је пронађено 36 изолата (13 изолата *D. flagrans* и 23 изолата из рода *Arthrobotrys*) из 1286 узорак (2,8%; Larsen и сар, 1994) а у Ирској је забележен већи диверзитет јер је из 150 узорак пронађено 6 изолата (4%) из 4 рода (*Drechmeria*, *Duddingtonia*, *Hirsutella* и *Monacrosporium*; Kelly и сар, 2009). Највећи успех је забележио Sanyal (2000), који је у Индији од 19

свежих узорака измета оваца успео да изолује по један изолат *A. oligospora* и *D. flagrans*, што је 10,5% позитивних. Одсуство других нематофагних гљива може бити последица времена извођења теста копрокултуре, када су овце биле затворене у стаји и храњене сувом балираном биомасом у којој није било спора. Да су животиње биле на пашњаку, било би већих шанси за проналажење других изолата нематофагних гљива. Захваљујући њиховом одсуству, нема сумње да је у тесту копрокултуре на редукцију ларвица стронгилида оваца утицао само додати изолат *D. flagrans* MUCCL 9827. Што се тиче гљиве из рода *Pilobolus* која је нађена у измету оваца, нема бојазни да је утицала на предаторску активност *D. flagrans*, јер је раније доказано да овај род, уз друге гљиве и бактерије које се могу наћи у измету преживара, не утиче на способност гљиве да хвата L_3 у копрокултури за разлику од огледа на агару (Grønvald и сар, 2004).

Тест копрокултуре је урађен са 11 експерименталних јединица због искључења једне животиње која је имала недовољан ниво јаја (свега 38 јпг) за испитивање *in vitro* ефекта *D. flagrans* MUCCL 9827. Постојала је потреба да се управо та животиња укључи у оглед, јер је била заражена изолатом стронгилида резистентним на ИВМ у нивоу од 175 јпг, а циљ примене нематофагних гљива је управо контрола резистентних изолата. Након што је терапија ИВМ елиминисала већину популације паразита, дошло је до опоравка организма и јачања имунитета што је резултирало морталитетом преживелих резистентних стронгилида а тиме и смањењем броја њихових јаја до нивоа када се овца ипак морала искључити из огледа. Друге три животиње су искључене због велике варијације у приносу ларвица између три понављања у контролној групи. Налаз различитих приноса ларви из истог узорка је могућ због неједнаке дистрибуције јаја стронгилида у измету, где коефицијент варијације просечних вредности броја јаја може да варира од 22 до 270% (Peraud и сар, 2005). Познато је да се при поновљеном бројању јаја из истог узорка скоро никад не добије исти резултат, али избројане вредности морају одговарати Поасоновој расподели; у супротном то доказује да узорак није био добро хомогенизован пре почетка огледа, што је вероватнији узрок оваквом налазу пре него други биолошки феномен (Torgerson и сар, 2012). Измет коришћен за тест копрокултуре је код неколико оваца био у форми брабоњака, што је свакако отежало његову темељну хомогенизацију, упркос употреби механичког миксера. Недовољна хомогенизација је могла да доведе до статистички значајне разлике у приносима ларвица у оквиру истог контролног узорка. Та чињеница онемогућава правилну интерпретацију ефекта гљиве на редукцију ларвица, те је било логично изоставити спорне експерименталне јединице из тумачења резултата.

Резултати теста копрокултуре су показали слаб, дозно-зависни ефекат изолата *D. flagrans* MUCCL 9827 *in vitro* у распону од 11 до 29% (Табела 21), што је незнатно мање у односу на претходне резултате где је изолат гљиве постигао 32,45% редукције (Симин и сар, 2012). На основу мале разлике у редукцији између две највеће дозе хламидоспора (само 4% у корист 20:1), бољој активности против стронгилида резистентних на ИВМ и најмањем броју негативних случајева, одређено је да је за изолат MUCCL 9827 оптималан ХПГ:ЈПГ однос 10:1 са укупном редукцијом од 25% (Табела 22). Након прерачунавања, установљено је да је у претходном тесту копрокултуре број ХПГ варирао од 1-12 (Симин и сар, 2012), а ХПГ:ЈПГ однос од приближно 10:1 је био у 4 узорка, уз остварену просечну редукцију L_3 од око 50% (у 1 узорку је активност изостала), што је дупло више у односу на овај оглед. У осталим узорцима у којим је однос ХПГ:ЈПГ био 1-5:1 је просечна редукција L_3 била 18,06 % (уз 3 негативна). Непознаницу при тумачењу резултата уноси

чињеница да је најбољи појединачни ефекат од 86,49% тада забележен при односу ХПГ:ЈПГ 5:1. Међутим, те налазе треба опрезно тумачити имајући у виду само једну репликацију по узорку.

У доступној литератури, део аутора наводи да се *in vitro* ефекат *D. flagrans* не повећава значајно апликацијом веће количине хламидоспора (Bird и Herd, 1995; Ojeda-Robertos и сар, 2008; Ojeda-Robertos и сар, 2015), док су други утврдили супротно (Grønvold и сар, 2004; Sanyal, 2004; Sanyal и сар, 2008). Постоји неколико студија у којима је ХПГ:ЈПГ однос 10:1 постигао редукцију ЛЗ приближну највећој коришћеној дози хламидоспора. Bird и Herd (1995) су утврдили да је доза гљиве (изолат из канадске колекције) од 100:1 ХПГ:ЈПГ повећала редукцију ларвица малих стронгилида коња за 3,4% у односу на десет пута мању дозу од 10:1 која је постигла висок проценат редукције у тесту копрокултуре (90,5%). Наспрам тога, најмањи однос 1:1 је забележио 32,1% редукције Л₃ што се није значајно разликовало од броја ЛЗ у контролним узорцима. Мексички изолат FTHO-8 је у дози 5-10:1 постигао 50% већу редукцију Л₃ *H. contortus* него дозе у распону 10,1-55,9:1 (Ojeda-Robertos и сар, 2008). У другом експерименту (Ojeda-Robertos и сар, 2015) исти изолат је побољшао активност након повећања односа ХПГ:ЈПГ; одређено је да је оптимални однос 10:1 за који је забележена редукција ЛЗ од 53,8%. Повећањем концентрације спора 10х, изолат је имао бољи учинак за око 8%, а након повећања од 100х за 28%, али то није било статистички значајно. Променљив *in vitro* учинак индијског „Chhattisgarh“ изолата *D. flagrans* објавио је Sanyal са сарадницима (2008) за ХПГ:ЈПГ однос 10:1 који је проглашен као „оптимални“ у другим истраживањима. При мањем броју јаја желудачно-цревних стронгилида коза од 100 ЈПГ, доза 10:1 је постигла свега 17% редукције док је за највећу FEC вредност (1000 ЈПГ) редукција ЛЗ била око 80%.

Ефекат примене других ХПГ:ЈПГ односа на редукцију Л₃ паразитских нематода домаћих животиња који представљају резултате испитивања различитих аутора, а тачно или приближно се поклапају са ХПГ:ЈПГ односима који су тестирани у овој докторској дисертацији, су сумирани и приказани у Табели 23.

Табела 23. Упоредни приказ ефикасности различитих изолата при одређеним ХПГ:ЈПГ односима

Врста паразита	Изолат <i>D. flagrans</i>	ХПГ:ЈПГ однос	Т (°C)	ЈПГ*	Принос ЛЗ у контрол и (%)*	ЛПГ у контроли *	% ред. ЛЗ	Реф.
<i>H. contortus</i> , <i>Trichostrongylus spp.</i> , <i>T. circumcincta</i> , <i>Oesophagostomum/Chabertia</i>	MUCL 9827	20:1 10:1 5:1 2:1	25	739 (105- 1213)	17,37 (8,82- 32,40)	112,25 (16-154)	29,02 25,18 18,11 11,31	Резултати дисертације
<i>H. contortus</i> , <i>Trichostrongylus spp.</i> , <i>T. circumcincta</i> , <i>Oesophagostomum/Chabertia</i>	MUCL 9827	10:1 1-5:1	25	340	16,25 (2,32- 33,04)	35,43 (14,29- 105,71)	50 18,06	Симин и сар, 2012
Мале стронгилиде коња	Кана- дски изолат	1:1 10:1 100:1	26-28	759 864 735	28 6,1 2,9	212,5 52,4 21,3	32,1 90,5 93,9	Bird и Herd, 1995
<i>C. oncophora</i>	CI3 CI4	25:1	20	250	69	172,5	81,1 63,3 84,0	Fernández и сар, 1999

Врста паразита	Изолат <i>D.flagrans</i>	ХПГ:ЛПГ однос	Т (°C)	ЛПГ*	Принос ЛЗ у контрол и (%)*	ЛПГ у контроли *	% ред. ЛЗ	Реф.
	CIII4 Troll A						75,1	
<i>C. oncophora</i>	Troll A	0,2:1 2,4:1 23,8:1 47,6:1 190,5:1	20-22	1050	Око 29	>300	93 Није наведен о Није наведен о 99 99	Grønvold и cap, 2004
<i>H. contortus</i> , <i>Trichostrongylus spp.</i> , <i>Cooperia spp.</i>	Инди- јски „Gujarat “ изолат	1,3:1; 12,5:1;125: 1 0,3:1; 2,9:1; 28,6:1 0,1:1; 1,4:1; 14,3:1	28	80 350 700	57,08 63,81 66,67	46 223 467	29,9; 72,1; 81,7 46,3; 82,4; 98,1 55,7; 78,9; 99,3	Sanyal , 2004
<i>H. contortus</i>	CBS 583.91	100:1	25	200	Није наведено	Није наведено	85,66%	Shams Ghahfarok hi и cap, 2004
<i>H. contortus</i> , <i>Trichostrongylus spp.</i> , <i>Cooperia spp.</i>	Инди- јски „Chhattisgarh“ изолат	10:1; 100:1; 1000:1 2:1; 20:1; 200:1 1:1; 10:1; 100:1	28	100 500 1000	40	40 200 400	17; >90; >95 50; 85; 99 50; 80; 99	Sanyal и cap, 2008
<i>H. contortus</i>	FTHO-8	0,09- 4,99:1 ² 5-10:1 ² 10,1- 55,9:1 ²	25,4	15.693 ₁	22,3 ²	411 ²	76,6 ² 84,5 ² 32 ²	Ojeda- Robertos и cap, 2008
Мале стронгилиде коња	FTHO-8	4:1; 8:1; 15:1; 30:1 2:1; 3:1; 6:1; 13:1 1:1; 1:1; 2:1; 5:1	Па- шњак ; просе к 15°C	257 652 1647	42 Није наведено 46	100 245 736	84; 81; 91; 99 92; 95; 97; 99 97; 95; 98; 99	Paz-Silva и cap, 2011
<i>H. contortus</i>	FTHO-8	1:1 10:1 100:1 1000:1	25	1000	1,5	15 (до 20)	33,3 53,8 61,5 82,1	Ojeda- Robertos и cap, 2015 - ЈАЈА
<i>H. contortus</i>	FTHO-8	1:1 10:1 100:1 1000:1	25	-	-	Око 290	37,0 84,9 92,3 92,3	Ojeda- Robertos и cap, 2015 - ЛАРВЕ

Разлика у редукцији ларвица између различитих и истих изолата коришћених у наведеним студијама (Табела 23) зависи од почетног нивоа јаја и количине додатих елемената гљиве. Повећање ХПГ углавном доводи до већег, не увек статистички значајног, процента редукције што при том не значи да је већа количина хламидоспора која се дода на једно јаје стронгилида и оптимална, и ту су добијени резултати теста копрокултуре за изолат *D. flagrans* MUCL 9827 у складу са подацима других аутора (Bird и Herd, 1995; Grønvold и сар, 2004; Sanyal, 2004; Sanyal и сар, 2008; Ojeda-Robertos и сар, 2015).

Почетни ниво јаја директно утиче на принос и концентрацију L_3 за тест копрокултуре. У овој студији, просечан принос L_3 стронгилида је износио 17,37% што је потпуно у складу са претходним налазом код исте популације паразита (Симин и сар, 2012). Кад је у питању измет малих преживара, много мањи проценат развоја ларвица у контролним копрокултурама у односу на овај резултат су у два наврата забележили Мексиканци (5,3% код коза, Ojeda-Robertos и сар, 2005; и свега 1,5% код оваца, Ojeda-Robertos и сар, 2015). Веће приносе L_3 су постигли Ojeda-Robertos и сарадници (22,3% L_3 *H. contortus* код оваца; 2008), Индијци (40% код коза, Sanyal и сар, 2008; и 57-67% код оваца, Sanyal, 2004) и Американци (Terill-a и сарадници, 2004; 42% у копрокултурама узорака узетих од коза).

Принос L_3 у копрокултури директно зависи од температуре због разлика у брзини развоја и оптималним захтевима појединих врста стронгилида. Такође, температура утиче и на нематофагну активност *D. flagrans*, али су ту забележени опречни налази у погледу оптималне температуре. Fernández и сарадници (1999) су показали да је максимални учинак *D. flagrans* био бољи на 15°C (редукција L_3 82,4-96,2%) у поређењу са вишом (20° C; 63,3-84%) и нижом температуром (10° C; 20,3-24,9%) од наведене. У студији иранских научника, закључено је да је максималну предаторску активност неопходна температура у распону 15-25°C (Shams Ghahfarokhi и сар, 2004). Paraud и сарадници (2006) су забележили бољу активност на нижој температури (21 наспрам 28°C). Morgan и сарадници (1997) испитујући активност *D. flagrans* у температурном опсегу 4-33°C проналазе да је максимална активност била на између 25-28°C. Неки истраживачи проналазе да је оптимална температура за предаторску активност била још виша и износила је 30°C (Grønvold и сар, 1996; Buske и сар, 2013). У овом истраживању *in vitro* огледи су постављени само на 25°C и није испитана активност изолата на другим температурама. Наведену температуру је добављач препоручио као оптималну за развој *D. flagrans* MUCL 9827 што је у складу је са подацима за друге изолате где је коришћен исти температурни режим (нпр. Sanyal, 2000). Разлика у ефикасности *D. flagrans* у односу на температуру у другим *in vitro* студијама где је одређен и ХПГ:ЈПГ однос је приказана у Табели 23.

На развој ларвица у копрокултури осим услова култивације (влага, температура, дужина инкубације) може да утиче и локални изолат стронгилида и тиме да доведе до ниског приноса L_3 (Ojeda-Robertos и сар, 2005). То је прилично неповољно, јер је познато да ако је принос ларвица у постављеној копрокултури на високом нивоу, то представља важан подстицај за формирање замки *D. flagrans* и постиже се боља предаторска активност гљиве (Morgan и сар, 1997; Sanyal и сар, 2008; Paz-Silva и сар, 2011). Ипак, примењујући ту чињеницу у анализи добијених резултата, није било могуће утврдити законитости под којим функционише испитивани изолат MUCL 9827. Узимајући у обзир просечан принос L_3 у контролним групама 11 узорака који илуструју колико је L_3 било на располагању за стимулацију гљиве, као и њихову редукцију за одређене дозе ХПГ

(Табела 21), види се да је највећи ефекат постигнут при ХПГ:ЈПГ односима 20:1 и 10:1 у узорцима 1, 10 и 11 где је било расположиво 124, 154 и 125 ЛПГ, тим редом. Насупрот овоме, у узорцима 3 и 9 у којима је број ЛПГ био приближан претходним (107 ЛПГ за узорак 3 и 129 ЛПГ за узорак 9) што упућује на то да би предаторска активност гљиве требала бити подједнако добро стимулисана, редукција L_3 је потпуно изостала у свим посматраним дозама. Још више збуњује налаз редукције у узорку 8 где је било само 16 ЛПГ, а најмања концентрације спора (2:1) је уз дозу ХПГ:ЈПГ 10:1 постигла максималну редукцију од око 36%, док највећа доза од 20:1 није имала никаквог ефекта. Већа редукција L_3 у корист мањег ХПГ:ЈПГ односа је забележена у узорцима 1 (дозе 5:1 и 2:1), 7 (дозе 20:1 и 5:1) и 10 (дозе 10:1 и 5:1). Како је у сваком од 3 поменута узорка било више од 100 ЛПГ, јасно је да број ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца овде није био једини фактор од кога зависи нематофагна активност изолата *D. flagrans* MUCL 9827. Претходни оглед (Симин и сар, 2012) потврђује ову хипотезу, јер је тамо постигнута боља активност за однос 10:1 уз 3х мањи ЛПГ (Табела 23).

In vitro активност три врсте нематофагних гљива (*Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys oviformis* и *Geniculifera eudermata*) није зависила од броја расположивих ларви у истраживању аустралијских научника (Waller и Faedo, 1993). Међутим, значај присуства адекватног броја ларви који ће стимулисати предаторску активност *D. flagrans* је најбоље илустрован у студији Ojeda-Robertos и сарадника (2015) у којој је *in vitro* ефекат представљен поређењем додатих јаја и ларви за одређену густину спора. Када је број ларви био већи 19 пута (15 ЛПГ наспрам 290 ЛПГ), дошло је до повећања редукције и свим ХПГ:ЈПГ односима, а највише у оптималном 10:1 где је забележен бољи ефекат за 31,1%.

Осим броја ларви, у појединим истраживањима је показано да и врста нематода може да утиче на предаторску ефикасност *D. flagrans*. Значајне разлике у хватању L_3 *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* и *Trichostrongylus colubrififormis* су доказали Paraud и сарадници (2006) испитујући ефикасност *D. flagrans* Troll A, при чему је *H. contortus* највише а *T. circumcincta* најмање хватана врста. Њихов налаз је делимично у складу са запажањима Waghorn и сарадника (2003) где је *D. flagrans* највише редуковала *H. contortus*, па *T. circumcincta* а најмање *T. colubrififormis*. Ипак, значајне разлике у редукцији различитих врста стронгилида нису постојале. Sanyal (2004) није забележио никакву зависност нематофагне активности индијског изолата у односу на тестиране врсте стронгилида оваца (*Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus spp.* и *Cooperia spp.*), што је потпуно у складу са налазом америчких колега за ефекат данског изолата против L_3 истог рода/врсте (Terill и сар, 2004).

Испитивања активности изолата *D. flagrans* MUCL 9827 нису обухватила ефикасност против различитих врста стронгилида оваца на имању, те се не може извући тачан закључак о томе. На основу генеричког састава стронгилида у првом (*H. contortus* 54,8%, *Trichostrongylus spp.* 41,6% и *T. circumcincta* 3,6%; Симин и сар, 2012) и другом тесту копрокултуре (ИВМ осетљиви изолати: *Trichostrongylus spp.* 46%, *Oesophagostomum/Chabertia* 31%, *H. contortus* 15% и *T. circumcincta* 8%; ИВМ резистентни изолата: *Trichostrongylus spp.*; садашњи налаз) се само може претпоставити да би генерални учинак изолата MUCL 9827 био бољи да је у култури било више L_3 *H. contortus*, имајући у виду константно добру активност *D. flagrans* против те врсте.

Познато је да различити изолати нематофагних гљива могу да имају веома различиту активност у *in vitro* условима. Mendoza-De Gives и Vazquez-Prats (1994) су радећи са *Arthrobotrys*

oligospora забележили да је за неке изолате потребно додати само пар конидија а за друге много већи инокулум да би било редукције ларвица *H. contortus*. С друге стране, постојали су и други изолати са веома ниском или апсолутно никаквом нематофагном активношћу. Сличну интраспецијску варијабилност су забележили и Холанђани посматрајући ефекат *A. oligospora* против биљних нематода (Den Belder и Jansen, 1994). Значајне разлике у нематофагној активности различитих изолата *Arthrobotrys robusta* против *Haemonchus placei* су забележили и бразилски научници (Арауџо и сар, 1993). Поједине гљиве, попут *A. robusta*, имају добру активност у чистим културама а веома слабу или никакву када се додају у овчији измет, који можда негативно утиче на нематофагну активност одређених изолата те врсте (Mendoza-De Gives и Vazquez-Prats, 1994).

Ни *D. flagrans*, примењивана у истим или сличним дозама у студијама разних аутора, није изузетак када је у питању нематофагни учинак различитих, чак и истих изолата (сумирано у Табели 23). У огледима са данским изолатима гљиве тестираних под истим условима *in vitro*, Larsen и сарадници (1991) су показали различите проценте редукције за 7 изолата (*L3 Ostertagia ostertagi*) а Fernández и сарадници (1999) за 4 изолата (*L3 Cooperia oncophora*), при чему је у другој студији било и случајева без редукције ларвица. У два различита *in vitro* огледа *D. flagrans* Troll A је имала другачију редукцију на температури од 20°C и сличним ХПГ:ЈПГ односима против желудачно-цревних стронгилида говеда: 75,1% (ХПГ:ЈПГ 25:1; Fernández и сар, 1999) наспрам >93% (ХПГ:ЈПГ 24:1; Grønvold и сар, 2004) *L3 C. oncophora*. Слично је забележено и за два бразилска изолата *D. flagrans* (AC001 и CG722) где је активност такође била променљива у два наврата: бољу редукцију *L3* малих стронгилида коња је показао изолат AC001 (Braga и сар, 2011) док је изолат CG722 био успешнији против *L3* говеђих стронгилида (Silva и сар, 2013), оба пута без значајне разлике у ефикасностима.

Као што је истакнуто, *D. flagrans* MUCCL 9827 је у овом (поглавље **РЕЗУЛТАТИ**) и прошлом тесту копрокултуре (Симин и сар, 2012) имала подједнак ефекат у редукцији *L3* желудачно-цревних стронгилида оваца. Ефекат овог изолата *in vitro* (под идентификационим бројем CBS 565.50- види Табелу 3) су у студији потраге за нематофагном гљивом која може да се користи у контроли слободноживећих стадијума стронгилида оваца испитали Waller и Faedo (1993) и нису забележили никакву предаторску активност. У другој студији, исти изолат *D. flagrans* такође није имао никаквог ефекта против нематода корена биљака *Meloidogyne hapla* и *M. incognita* (Den Belder и Jansen, 1994). Иако је изолат *D. flagrans* MUCCL 9827 у овом и прошлом огледу (Симин и сар, 2012) постигао много нижу редукцију *L3* у односу на друге изолате, доказано је да нематофагна активност ипак постоји, што је велики успех јер је у свим претходним испитивањима она потпуно изостала (Den Belder и Jansen, 1994; Waller и Faedo, 1993). Имајући у виду ове чињенице, уз напомену да је забележена веома слаба активност овог изолата на гладном агару, нејасно је да ли је у тесту копрокултуре дошло до редукције *L3* само њиховим хватањем у замке. Boguš и сарадници (2005) су показали да *D. flagrans* има више начина у борби против нематода; поред замки, њени метаболити могу значајно утицати на мотилитет паразита. Тако је и изолат *D. flagrans* CBS 565.50 (MUCCL 9827) лучио метаболите који су значајно утицали на мотилитет *L3 Heligmosomoides polygyrus*, трихостронгилидне нематодe ГИТ-а мишева. Слично овоме, и Waller и Faedo (1993) су показали да је гљива имала ларвицидно (али не и овицидно нити предаторско) дејство против стронгилида оваца.

Без обзира на механизам који је довео до редукције L_3 , на основу добијених резултата се може закључити да изолат *D. flagrans* MUCL 9827 није погодан за биолошку контролу желудачно-цревних стронгилида оваца. Изолат показује недоследност у хватању ларвица стронгилида под датим *in vitro* условима. Galper и сарадници (1995) тако описују учинак M2 изолата *A. oligospora*, врсте која је такође формира мреже замки а филогенетски је блиска *D. flagrans*.

6.5. Коментари свеукупног налаза дисертације

Због великих губитика које паразитски гастроентеритис изазива код оваца на имању, индикована је примена антихелминтика. Испитивање ефикасности ивермектина против локалне популације желудачно-цревних стронгилида је урађено због тога што је основни предуслов употребе нематофагних гљива у контроли паразитизма оваца постојање резистентних изолата паразита. Установљено је да су највероватнији узроци резистенције скоро искључива примена макроцикличних лактона и одсуство довољног познавања стратегија које имају за циљ спровођење дехелминтизације само када је резерва ларвица осетљивих на ИВМ довољна.

У просеку, ефикасност ИВМ против желудачно-цревних стронгилида на имању износи око 80%, што је ниво који фармери често не запазе (Sargison, 2012). Стање третираних оваца у оваквим случајевима бива клинички побољшано, упркос реално смањеној ефикасности лека и присуству резистентних паразита, што није неуобичајено у теренским условима. Резистенција се на терену примети тек када ефикасност контроле паразита драстично падне, али многи случајеви остају и непотврђени (Paradopoulos и сар, 2012).

Када би се у контроли паразитског гастроентеритиса оваца користили биолошки агенси, поставља се питање како би се изолат *D. flagrans* MUCL 9827 показао у *in vivo* условима. Познато је да само 10% хламидоспора преживи пасажу кроз дигестивни тракт овце (Grønvold и сар, 2004; Ojeda-Robertos и сар, 2009), а неки изолати нису погодни за *in vivo* примену јер уопште не преживе (Larsen и сар, 1991). Осим тога, забележен је низ неуспеха у контроли популације ларвица стронгилида на пашњаку и када су се примењивали изолати за које је раније доказана нематофагна активност у условима на пашњаку (Faessler и сар, 2007; Rocha и сар, 2007; Ере и сар, 2009; Silva и сар, 2010). Чак и ако претпоставимо да би изолат *D. flagrans* MUCL 9827 био успешан у проласку кроз дигестивни тракт оваца и када би хватао ларвице на пашњаку, постоји могућност да би примена гљиве довела до још већих проблема конкретно на имању у Србобрану. У неколико истраживања су изолати *D. flagrans* показали различиту ефикасност у редукцији појединих врста на пашњаку, уз налаз смањене или потпуног одсуства редукције популације ларвица из рода *Trichostrongylus* (Wright и сар, 2003; Mendoza-De Gives и сар, 2006). Како је управо овај род резистентан на терапију ИВМ, постоји ризик да када би гљива смањила број осталих врста *H. contortus*, то резултира додатном селекцијом на АР због присуства више ларвица рода *Trichostrongylus* на пашњаку. Упркос способности изолата да *in vitro* хвата резистентне *Trichostrongylus* ларвице, поставља се питање успешности у теренским условима.

Наредна истраживања би требало усмерити на поналажње домаћег изолата *D. flagrans*. Њихова предност се огледа у томе што су они еволуирали под локалним условима на пашњацима и што то смањује потешкоће везане за карантин при тестирању и пуштању изолата другог порекла

(Larsen и сар, 1994). Локални изолати су у случају гљиве *Arthrobotrys oligospora* показали бољим у редукцији стронгилида оваца (*L3 H. contortus*) од референтних који се чувају у миколошким колекцијама (Shams Ghahfarokhi и сар, 2004).

У односу на показане резултате *in vitro*, изолат *D. flagrans* MUCL 9827 би могао да се примењује као додатна мера у контроли стронгилидозе домаћих животиња додавањем суспензије хламидоспора директно у фекалну масу на пашњаку, слично као у другим истраживањима (Grønvdal и сар, 1989; Paz-Silva и сар, 2011). Међутим, ова мера се не би могла лако примењивати код говеда, имајући у виду њихову бројност када се напасање користи као део узгојне праксе, али би реалније било примењивати је код еквида.

Имајући у виду АР статус на имању, једина опција за ефикасну контролу стронгилида оваца у будућности лежи у примени низа мера интегрисаног приступа у контроли паразита. Најбољи пример за то су скорашњи резултати паразитолога са Новог Зеланда, који су успели да у извесној мери поврате осетљивост *T. circumcincta* на антихелминтике примењујући стратегију „best practice parasite management“ посебно скројену за сваку фарму (Leathwick и сар, 2015). Укратко, то је подразумевало скоро искључиву примену комбинација антихелминтика, уз одабир правог времена апликације узимајући у обзир расположиву резерву ларвица осетљивих на лекове (на основу епизоотиолошких података и копролошких прегледа) и обавезну годишњу контролу њихове ефикасности. У зависности од локалних услова, користили су и друге мере попут напасања различитих врста животиња, комбинације пашњачких површина итд. Од посебног значаја је била примена селективног третмана за очување резерве ларвица осетљивих на лекове, тако да су овце биле важан извор „refugia“ када то није могло другачије обезбедити.

На испитиваном имању је у октобру 2015. више од пола од 29 оваца непотребно третирано ИВМ, на основу налаза броја јаја. Познато је да се код нас приликом дехелмитизације третирају све овце, а та пракса, како је речено, води у настанак резистенције. Слично је, на пример, у Чешкој где, иако је резистенција (на бензимидазоле) први пут дијагностикована крајем деведесетих, половина произвођача још увек третира све овце у запату (Vadlejch и сар, 2014), док се и у Ирској скоро увек третирају све овце у стаду (Patten и сар, 2011). Зато је примена стратегија које подразумевају селективни третман оваца веома важна у очувању ефикасности антихелминтика, па се индикатори попут FAMACHA© дијаграма могу (и даље) примењивати на имању.

Од додатних мера контроле које искључују употребу антихелминтика је примена екстракта биља један од начина за борбу против стронгилида оваца, где је изванредан потенцијал показао екстракт домаћег генотипа белог лука (Симин и сар, 2015). Даље, на испитиваној фарми је реална примена појачане исхране посебно у ризичним периодима године када су услови за развој ларвица веома повољни, што је важно имајући у виду број животиња и ограничену површину пашњака. Напасање на ораницама после скидања различитих усева је са аспекта контроле резистенције на овом имању добра пракса јер се смањује ниво реинфекције уз очување продуктивности, а овце увек проведу део времена на пашњаку уносећи довољан број ларвица осетљивих на лекове које разблажују АР. Недостатак ове мере се огледа у томе што је овакав режим напасања веома зависан од праксе обраде земљишта локалних ратара, и осим на сопственим површинама, тешко да се може увек реализовати.

Посебно корисна мера је узгој отпорних раса или селекција линија виртемберг оваца на отпорност/толеранцију према желудачно-цревним стронгилидама. Коначно, имајући у виду

развој и комерцијализације вакцине против *H. contortus* у Аустралији, чини се да би у будућности контрола желудачно-цревне стронгилидозе оваца могла да буде једноставнија и да се остварује без примене нематофагних гљива.

7. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата који су добијени приликом израде ове докторске дисертације, изведени су следећи закључци:

1. Код оваца на испитиваном имању паразитира 11 врста желудачно-цревних стронгилида:
 - у сиришту: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* и *Trichostrongylus axei*;
 - у танком цреву: *Trichostrongylus colubriformis*, *Nematodirus spathiger*, *Nematodirus filicollis*, *Nematodirus abnormalis* и *Strongyloides papillosus*;
 - у дебелом цреву: *Chabertia ovina*, *Oesophagostomum venulosum* и *Trichuris discolor*Доминантна врста током целе године је *H. contortus*, у просеку чини 72,3% популације а највиши ниво достиже у летњим месецима. Род *Trichostrongylus* је други по значају уз заступљеност од 17,6% и преовлађује у јесењим месецима.
2. Забележени клинички симптоми, употпуњени копролошким, патоанатомским и налазом интензитета инвазије (који је висок односно умерен за 31,7% и 28,4% прегледаних животиња) потврђују да паразитски гастроентеритис (ПГЕ) има значајан утицај на здравље, добробит и производне параметре оваца.
3. На основу података о интензитету инвазије, потребно је применити дехелминтизацију у 60,1% инвадираних оваца.
4. Помоћу FAMACHA© дијаграма, индикатора за процену клиничке анемије појединачних оваца у циљу селективног третмана и смањења притиска за развој резистенције на коришћене антихелминтике, нису успешно идентификоване овце које су имале анемију посматрану кроз вредност хематокрита (негативна корелација, $\rho = -0,2446$).
5. Терапија ивермектином није довољно ефикасна у контроли желудачно-цревних стронгилида оваца на имању због присуства резистенције.
6. Установљено је да ефикасност ивермектина износи око 80% (у распону од 67-99%). У односу на генеричку ефикасност, најмање је осетљив род *Trichostrongylus* (ПР(%)=33-80), резистенција коју додатно треба испитати постоји код *Teladorsagia circumcincta* (ПР(%)=93; 95% ИП: 83-97), а сумња на резистенцију је установљена код *Haemonchus contortus* (ПР(%)=97; 95% ИП: 89-99). Резистенција постоји и код рода *Nematodirus*, где је редукција јаја била 74% (95% ИП: 38-89).
7. Испитивани изолат нематофагне гљиве *Duddingtonia flagrans* MUCL 9827 испољава биолошки ефекат у *in vitro* условима, али су развој замки и способност хватања инфективних ларвица стронгилида оваца уочени само у једној култури. Налаз трофичних хифа и хламидоспора у телу ухваћене ларвице потврђују њихово искоришћавање као допунског извора хране овог изолата *D. flagrans*.

8. *Duddingtonia flagrans* MUCL 9827 је у тесту копрокултуре постигла дозно-зависну редукцију ларвица желудачно-цревних стронгилида оваца у распону од 11,31-29,02%, али та редукција није била значајна у односу на контролу ($p=0,827$). Због мале разлике (4%) у редукцији у односу на највећи ХПГ:ЈПГ однос, боље активности против ИВМ резистентних ларвица и најмањег броја негативних случајева, одређено је да је у датим условима огледа оптимални ХПГ:ЈПГ однос 10:1.
9. На основу резултата у *in vitro* условима, изолат *Duddingtonia flagrans* MUCL 9827 није погодан за биолошку контролу желудачно-цревних стронгилида оваца.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Арсић, С., Јовановић, М. (2013). Могућности за производњу биомасе на ливадама и пашњацима као фактор унапређења овчарске производње у Србији. *Агрознање*, 14(2), 297-307.
2. Бошковић, В., Марковић, Р. (1981). Испитивање антихелминтске ефикасности Ринтала. *Ветеринарски гласник*, 35(4), 357-362.
3. Вујић, Б., Анић, Н. (1958). Прилог упознавању неких штета од субклиничких паразитоза оваца. *Вет.гласник* 12(8):604-608.
4. Вујић, Б., Петровић, К., Север, Н. (1961). Примена "Франтин"-а у сузбијању нематодирозе оваца, *Ветеринарски гласник*, 15(5), 377-382.
5. Вујић Б., Петровић К., Крџалић П. (1964). Ефикасност тиабендазола против желуачно-цревних нематода. *Ветеринарски Гласник* 18 (3) 365-368.
6. Вујић, Б., Петровић, К., Радовановић, М. (1972). Ефикасност употребе тетрализолоа у сузбијању паразитарних болести оваца. *Praxis Veterinaria* 20(1-2), 81-88.
7. Вујић, Б., Костовић, Д. (1973). Актуелна питања ветеринарске медицине у борби против ектопаразита домаћих животиња. *Ветеринарски гласник*, 27(12), 891-896.
8. Вујић, Б., Поп-Ценић, С., Благојевић, Р. (1976). Ново средство за терапију паразитског гастроентерита и верминозног бронхита. *Ветеринарски гласник*, 30(1), 11-17.
9. Вујић, Б., Анић, Н., Бошковић, В. (1980). О антипаразитицима и значају њихове употребе у овчарској производњи. *Ветеринарски гласник*, 34(8), 735-743.
10. Голошин, Р. (1968). Врсте желудачно-цревних нематода код оваца на подручју јужне Бачке и северног Баната. – I. Интензитет и динамика појављивања. *Ветеринарски гласник*, (3), 193-198.
11. Голошин, Р., Косовац, А., Пањевић-Блажевић, Т. (1968). Прилог познавању паразитске фауне домаћих животиња и неке дивљачи у Војводини. *Ветеринарски гласник*, 22(10), 857-864.
12. Димитријевић, С., Илић, Т. (2004). Резистенција на антхелминтике – распрострањеност, откривање и мере за њено превенирање. *Ветеринарски гласник* 58(5-6), 685-92
13. Ђурђевић, Ђ. (1992). Патолошка физиологија домаћих животиња, Београд, Научна књига.
14. Живанов, Д., Илијев, А. (1989). Резистенција паразита према антипаразитицима и механизам настајања резистенције. *Ветеринарски гласник* 43(1),99-105.
15. Ивановић, С., Јездимировић, Миланка, Ћупић, В., Димитријевић, Б. (2015). Ефикасност и безбедност примене антихелминтика у ветеринарској медицини.

26. саветовање ветеринара Србије, 10-13. септембар Златибор, Зборник кратких радова и садржаја, 253-262.
16. Катић Р., Миљковић В., Стаматовић С., Шибалић С., Цветковић Љ. (1967). Болести оваца, одбор за издавачку делатност Савеза ветеринара и ветеринарских техничара, СФРЈ.
17. Крџалић, П. (1966). Желудачно-цревне нематодне оваца Сјеничко-Пештерске висоравни са посебним освртом на динамику и интензитет понављања. Аутореферат дисертационог рада, Acta Veterinaria, 275-281.
18. Лалошевић В., Симин С. (2008). Ефекат дорамектина на желудачно-цревне и плућне нематодне оваца, Летопис научних радова Пољопривредног факултета, 32(1), 127-132.
19. Лалошевић, В., Јарак, М., Ђурић, С., Обрадовић, Н. (2011). Ефекат нематофагне гљиве *Duddingtonia flagrans* на гастроинтестиналне паразите код оваца. Зборник Матице српске за природне науке, 120, 243-248.
20. Лепојев О. (1963). Први налаз *Nematodirus abnormis* и *Nematodirus battus* код оваца и јагањаца у нашој земљи. Acta veterinaria (12(3-4), 79-82.
21. Лукьянченко, Т. А. (2000). Использование хищного гриба *Duddingtonia flagrans* для сокращения численности инвазионных личинок стронгилид лошадей. Vestnik zoologii 34(3), 67-72.
22. Невенић, В., Младеновић, Ж. (1959). Утицај фенотијазин брикета на плодност женки желудачно-цревних стронгилида оваца. Ветеринарски гласник, 13(8), 579-584.
23. Невенић, В., Шибалић, С.ц Цветковић, Љ., Лепојев, О., Кљајић. (1960). Прилог познавању проузроковача желудачно-цревне стронгилозе оваца извесних подручја НР Србије. Ветеринарски гласник 14 (1)29-31.
24. Петровић, К. (1958). Наша искуства у сузбијању желудачно-цревне стронгилозе код оваца на једном пољопривредном добру. Ветеринарски Гласник 12(9), 703-707
25. Петровић, К., Вујић, Б., Цветковић, М., Север, Н. (1960). Нематодироза оваца Сјеничко-Пештерске висоравни. Ветеринарски Гласник 14,(4), 239-242.
26. Поповић, Р. (2014): Сточарство у Републици Србији. Републички завод за статистику, Београд
27. РЗС (2008). Два века развоја Србије-статистички преглед. Републички завод за статистику, Београд
28. РЗС (2013). Попис пољопривреде 2012. године у Републици Србији, књига 2. Републички завод за статистику, Београд.

29. РЗС (2016). Број стоке у Републици Србији-стање 1. децембра 2015. године. Статистика пољопривреде. Број 032 - год. LXVI, 19.02.2016
30. Симин С. (2009). Желудачно-цревне и плућне стронгилиде оваца, Мастер рад, Пољопривредни факултет, Департман за ветеринарску медицину, Нови Сад, Србија.
31. Симин, С., Лалошевић, В., Куруца, Љ., Ђурић, С., Хајнал-Јафари. Т. (2012). Тест копрокултуре за процену редукције ларвица желудачно-цревних нематода оваца *in vitro* применом нематофагне гљиве, *Duddingtonia flagrans*. Савремена пољопривреда, 61(3-4) 255-264.
32. Симин, С., Куруца, Љ., Савовић, М., Шили, Т., Лалошевић, В. (2013). Желудачно-цревне нематодe у неколико запата пашних оваца у Војводини. Међународни симпозијум „Нове технологије у савременој сточарској производњи“, Нови Сад, 19-21 јун, стране 125-127.
33. Симин, С., Штрбац, Љ., Куруца, Љ., Лалошевић, В., Ердељан, М., Савовић, М. (2013а) Налаз *Parascaris equorum* код коња на националној изложби у Новом Саду, Србија. Четврто регионално саветовање „Узгој, репродукција и здравствена заштита коња“ , Конгресни центар Новосадског сајма, Нови Сад, 4-5 Октобар, 2013, pp 78-83.
34. Симин, С., Симин, В., Куруца, Љ., Савовић, М., Бугарски, Д., Лалошевић, В. (2014). Прелиминарни извештај о налазу резистенције на ивермектин код желудачно-цревних стронгилида оваца у Србији. Симпозијум ХВИ Епизоотиолошки дани Србије, Зрењанин, Србија, 6-7 Новембар, pp124-125.
35. Стојадиновић, В. (1985). Паразитозе и њихов значај за сточарство у јужном делу СР Србије. Praxis Veterinaria 33(1-2), 51-57.
36. Теплякова, Т. В., Ананько, Г. Г. (2009). Хищные грибы-гифомицеты против паразитических нематод. Защита и карантин растений, 6. 22-25.
37. Хаџовић, С., (1986). Новоодобрени лијекови. Veterinaria 35(2)271-258.
38. Цветковић, Љ., Шибалић, С., Лепојев, О., Пањевић, Ђ. (1966). Промене у крви јагањаца природно инфицираних трихостронгилидама током пашне сезоне. Acta Veterinaria, 217-228.
39. Цветковић, Љ., Лепојев, О. (1967). Врсте и динамика желудачно-цревних стронгилида јаганјаца са подручја средњег Баната. Зборник радова III конгреса ветеринара, Сарајево, стр. 568-575.
40. Цветковић, Љ., Голошин, Р., Ћатић, Г. (1970). Клиничка хемонхоза код оваца после јагњења и лечење Thibenzol-ом. Ветеринарски гласник, 24(5), 363-369.
41. Цветковић Љ., Голошин Р., Лепојев О. (1971) Деловање камбендазола на гастроинтестиналне нематодe оваца са нарочитим освртом на Haemonchus contortus, Ветеринарски гласник 15(10), 747-752.

42. Цветковић, Љ., Лепојев, О., Вулић, И. (1973). Испитивање расне отпорности цигаје мерино прекос и мерино кавказ према желудачно-цревним стронгилидама у природним условима инфекције. Ветеринарски гласник, 27(12), 867-872.
43. Цветковић, Љ. (1976). Хемиопрофилактика значајнијих пашних хелминтоза преживара. Praxis Veterinaria 24(1):23-31
44. Шибалић, С., Цветковић, Љ., Невенић, В. (1961). Прилог познавању штетног деловања желудачно-цревних паразита на прираст јагањаца у тову. Ветеринарски гласник, 15(5), 373-375.
45. Шибалић, С., Цветковић, Љ. (1996). Паразитске болести домаћих животиња, Универзитет у Београду.
46. Abbott, K.A., Taylor, M.A., Stubbings, L.A.: Sustainable Worm Control Strategies for Sheep. A Technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisors, 2nd ed. SCOPS, Malvern, 2009.
47. Aitken, I. (Ed.). (2007). Diseases of sheep. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
48. Al-Zubaidy, A. J., Altaif, K. I., Al-Qaisy, H. H. K., & Makkawi, T. A. (1987). Gross pathology and histopathology of haemonchosis in sheep and goats in Iraq. Veterinary parasitology, 23(3), 249-256.
49. Anan'ko, G. G., Teplyakova, T. V. (2011). Factors responsible for transition of the Duddingtonia flagrans carnivorous fungus from the saprotrophic to the zootrophic nutrition type. Microbiology, 80(2), 188-193.
50. Anderson, M. G., Rickards, R. W., & Lacey, E. (1999). Structures of flagranones A, B and C, cyclohexenoxide antibiotics from the nematode-trapping fungus Duddingtonia flagrans. The Journal of antibiotics, 52(11), 1023-1028.
51. Araújo, J. V., Santos, M. A., Ferraz, S., & Maia, A. S. (1993). Antagonistic effect of predacious Arthrobotrys fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. Journal of helminthology, 67(02), 136-138.
52. Araujo, J. M., Araújo, J. V., Braga, F. R., & Carvalho, R. O. (2010). In vitro predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of Strongyloides westeri. Parasitology research, 107(1), 103-108.
53. Arias, M. S., Suárez, J., Cazapal-Monteiro, C. F., Francisco, I., López-Arellano, M. E., Piñeiro, P., & Paz-Silva, A. (2013). Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus Arthrobotrys (Duddingtonia) flagrans. Fungal biology, 117(7), 540-544.
54. Artho, R., Schnyder, M., Kohler, L., Torgerson, P. R., & Hertzberg, H. (2007). Avermectin-resistance in gastrointestinal nematodes of Boer goats and Dorper sheep in Switzerland. Veterinary parasitology, 144(1), 68-73.

55. Bailey, J. N., Walkden-Brown, S. W., & Kahn, L. P. (2009). Comparison of strategies to provide lambing paddocks of low gastro-intestinal nematode infectivity in a summer rainfall region of Australia. *Veterinary parasitology*, 161(3), 218-231.
56. Bartley, D. J., Jackson, E., Johnston, K., Coop, R. L., Mitchell, G. B., Sales, J., & Jackson, F. (2003). A survey of anthelmintic resistant nematode parasites in Scottish sheep flocks. *Veterinary parasitology*, 117(1), 61-71.
57. Barton, N. J. (1983). Development of anthelmintic resistance in nematodes from sheep in Australia subjected to different treatment frequencies. *International Journal for Parasitology*, 13(2), 125-132.
58. Baudena, M. A., Chapman, M. R., Larsen, M., & Klei, T. R. (2000). Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Veterinary Parasitology*, 89(3), 219-230.
59. Bentounsi, B., Zouiouech, H., Benchikh-Elfegoun, C., Kohil, K., & Cabaret, J. (2003). Efficacite comparee des specialites d'albendazole distribuees en Algerie. *Revue de médecine vétérinaire*, 154(10), 649-652.
60. Bentounsi, B., Attir, B., Meradi, S., & Cabaret, J. (2007). Repeated treatment faecal egg counts to identify gastrointestinal nematode resistance in a context of low-level infection of sheep on farms in eastern Algeria. *Veterinary parasitology*, 144(1), 104-110.
61. Bentounsi, B., Ouksel, M., & Kachtarzi, B. (2009). Efficacité comparée sur les strongles digestifs et respiratoires des ovins de douze spécialités d'ivermectine commercialisées en Algérie. *Revue Méd. Vét.*, 160(7), 329-334.
62. Besier, R. B., & Hopkins, D. L. (1988). Anthelmintic dose selection by farmers. *Australian veterinary journal*, 65(6), 193-194.
63. Besier, R. B. (2012). Refugia-based strategies for sustainable worm control: factors affecting the acceptability to sheep and goat owners. *Veterinary parasitology*, 186(1), 2-9.
64. Beveridge, I., Martin, R. R., & Pullman, A. L. (1985). Development of the parasitic stages of *Nematodirus abnormalis* in experimentally infected sheep and associated pathology. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 52(1), 119-131.
65. Beveridge, I., Ellis, N. J. S., Riley, M. J., & Brown, T. H. (1990). Prevalence of resistance in sheep nematode populations to benzimidazole and levamisole anthelmintics in the high rainfall areas of South Australia. *Australian veterinary journal*, 67(11), 413-415.
66. Bird, J., Herd, R. P. (1995). In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. *Veterinary Parasitology*, 56(1), 181-187.

67. Boag, B., & Thomas, R. J. (1985). The effects of temperature on the survival of infective larvae of nematodes. *The Journal of parasitology*, 71(3), 383-384.
68. Bogan, J. A., McKellar, Q. A. (1988). The pharmacodynamics of ivermectin in sheep and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 11(3), 260-268.
69. Boguś, M. I., Czygier, M., Ke, E., & Samborski, J. (2005). In vitro assessment of the influence of nutrition and temperature on growing rates of five *Duddingtonia flagrans* isolates, their insecticidal properties and ability to impair *Heligmosomoides polygyrus* motility. *Experimental parasitology*, 109(2), 115-123.
70. Borgsteede, F. H., Dercksen, D. D., & Huijbers, R. (2007). Doramectin and albendazole resistance in sheep in The Netherlands. *Veterinary parasitology*, 144(1), 180-183.
71. Bowman, D.D., (2009): *Georgis' parasitology for veterinarians* 9th Ed, Saunders, Elsevier Inc.
72. Braga, F. R., Araújo, J. V., Silva, A. R., Araujo, J. M., Carvalho, R. O., Tavela, A. O., Campos, A. K., Carvalho, G. R. (2009). Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Veterinary parasitology*, 163(4), 335-340.
73. Braga, F. R., Araújo, J. V., Araujo, J. M., de Oliveira Tavela, A., Ferreira, S. R., Soares, F. E. F., Benjamin, L. A. D., Frassy, L. N. (2011). Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae). *Experimental parasitology*, 128(4), 460-463.
74. Braga, F. R., Araújo, J. V., Soares, F. E., Geniêr, H. L., & Queiroz, J. H. (2012). An extracellular serine protease of an isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus. *Biocontrol Science and Technology*, 22(10), 1131-1142.
75. Braga, F. R., Araújo, J. V., Tavela, A. D. O., Vilela, V. L. R., Soares, F. E. D. F., Araujo, J. M., & Atahyde, A. C. R. (2013). First report of interaction of nematophagous fungi on *Libyostrongylus douglassii* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(1), 147-151.
76. Braga, F. R., de Freitas Soares, F. E., de Queiroz, J. H., Araujo, J. M., de Carvalho, L. M., de Mello, I. N. K., & Araújo, J. V. (2013). Culture medium characteristics on the predatory activity of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Biocontrol Science and Technology*, 23(11), 1336-1341.
77. Braga, F. R., Araujo, J. M., Araújo, J. V. D., Soares, F. E. D. F., Tavela, A. D. O., Frassy, L. N., & Mozzer, L. R. (2013a). In vitro predatory activity of conidia of fungal isolates of the *Duddingtonia flagrans* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(1), 108-110.
78. Braga, F. R., Araújo, J. V., Tavela, A. D. O., Vilela, V. L. R., Soares, F. E. D. F., Araujo, J. M., & Atahyde, A. C. R. (2013b). First report of interaction of nematophagous fungi on *Libyostrongylus douglassii* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(1), 147-151.

79. Burke, J. M., Kaplan, R. M., Miller, J. E., Terrill, T. H., Getz, W. R., Mobini, S., ... & Vatta, A. F. (2007). Accuracy of the FAMACHA system for on-farm use by sheep and goat producers in the southeastern United States. *Veterinary parasitology*, 147(1), 89-95.
80. Brunsdon, R. V. (1967). The significance of *Nematodirus* in New Zealand. *New Zealand veterinary journal*, 15(6), 105-108.
81. Burgess, C. G., Bartley, Y., Redman, E., Skuce, P. J., Nath, M., Whitelaw, F., & Jackson, F. (2012). A survey of the trichostrongylid nematode species present on UK sheep farms and associated anthelmintic control practices. *Veterinary parasitology*, 189(2), 299-307.
82. Buske, R., Santurio, J. M., de Oliveira, C. V., Bianchini, L. A., da Silva, J. H. S., & de la Rue, M. L. (2013). In vitro influence of temperature on the biological control activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitology research*, 112(2), 473-478
83. Cabaret, J., & Berrag, B. (2004). Faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy: average versus individually based estimations. *Veterinary parasitology*, 121(1), 105-113.
84. Calvete, C., & Uriarte, J. (2013). Improving the detection of anthelmintic resistance: evaluation of faecal egg count reduction test procedures suitable for farm routines. *Veterinary parasitology*, 196(3), 438-452.
85. Campbell, W. C. (Ed.). (1989). Ivermectin and abamectin. Springer Science & Business Media.
86. Campos, A. K., Araújo, J. V., Guimarães, M. P., & Dias, A. S. (2009). Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces. *Parasitology research*, 105(4), 913-919.
87. Ciannamea, E. M., Sagüés, M. F., Saumell, C., Stefani, P. M., & Ruseckaite, R. A. (2013). Soybean protein films. Characterization and potential as novel delivery devices of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores. *Biological Control*, 66(2), 92-101
88. Campos, A. K., Araújo, J. V., Guimarães, M. P., & Dias, A. S. (2009). Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces. *Parasitology research*, 105(4), 913-919.
89. Cai, K. Z., Liu, J. L., Liu, W., Wang, B. B., Xu, Q., Sun, L. J., & Yang, J. (2016). Screening of different sample types associated with sheep and cattle for the presence of nematophagous fungi in China. *Journal of basic microbiology*, 56, 214-228.
90. Calatrava, J., Sayadi, S., 2002. Milk production systems in rural development: the case of goat cheese making at the Eastern Alpujarras. *EAAP Publication* 99, 37-46.

91. Cezar, A. S., Toscan, G., Camillo, G., Sangioni, L. A., Ribas, H. O., & Vogel, F. S. F. (2010). Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 173(1), 157-160.
92. Chabala, J. C., Mrozik, H., Tolman, R. L., Eskola, P., Lusi, A., Peterson, L. H., & Campbell, W. C. (1980). Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *Journal of medicinal chemistry*, 23(10), 1134-1136.
93. Chaka, H., & Gizaw, D. (2009). Multiple anthelmintics resistant *Haemonchus contortus* in Dorper sheep imported from Republic of South Africa to Ethiopia. *Ethiopian Veterinary Journal*, 13(1), 31-39.
94. Chalmers, K. (1985). Detection of benzimidazole resistant *Nematodirus spathiger*. *New Zealand veterinary journal*, 33(4), 53-53.
95. Charon, K. M. (2004). Genes controlling resistance to gastrointestinal nematodes in ruminants. *Animal Science Papers and Reports*, 22(1), 135-139.
96. Chartier, C., Pors, I., Hubert, J., Rocheteau, D., Benoit, C., & Bernard, N. (1998). Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. *Small Ruminant Research*, 29(1), 33-41.
97. Chylinski, C., Cortet, J., Neveu, C., & Cabaret, J. (2015). Exploring the limitations of pathophysiological indicators used for targeted selective treatment in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology*, 207(1), 85-93.
98. Chandrawathani, P., Jamnah, O., Waller, P. J., Höglund, J., Larsen, M., & Zahari, W. M. (2002). Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small ruminants in Malaysia: a special emphasis on *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Research*, 33(6), 685-696.
99. Chandrawathani, P., Jamnah, O., Adnan, M., Waller, P. J., Larsen, M., & Gillespie, A. T. (2004). Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*, 120(3), 177-187.
100. Colvin, A. F., Walkden-Brown, S. W., Knox, M. R., & Scott, J. M. (2008). Intensive rotational grazing assists control of gastrointestinal nematodosis of sheep in a cool temperate environment with summer-dominant rainfall. *Veterinary Parasitology*, 153(1), 108-120.
101. Coop, R. L., & Kyriazakis, I. (1999). Nutrition–parasite interaction. *Veterinary parasitology*, 84(3), 187-204.
102. Cornell, S. J., Isham, V. S., & Grenfell, B. T. (2000). Drug-resistant parasites and aggregated infection–early-season dynamics. *Journal of mathematical biology*, 41(4), 341-360.
103. Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., & Waller, P. J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

- (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary parasitology*, 44(1), 35-44.
104. Coles, G. C., Jackson, F., Pomroy, W. E., Prichard, R. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., & Vercruysse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary parasitology*, 136(3), 167-185.
105. Cornell, S. J., Isham, V. S., Smith, G., & Grenfell, B. T. (2003). Spatial parasite transmission, drug resistance, and the spread of rare genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7401-7405.
106. Cooke, R. G. (1969). Two nematode-trapping hyphomycetes, *Duddingtonia flagrans* gen. et comb. nov. and *Monagrosporium mutabilis* sp. nov. *Transactions of the British Mycological Society*, 53(2), 315-319.
107. Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., & Scala, A. (2004). The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary parasitology*, 123(1), 121-131.
108. Cringoli, G., Veneziano, V., Jackson, F., Vercruysse, J., Greer, A. W., Fedele, V., ... & Rinaldi, L. (2008). Effects of strategic anthelmintic treatments on the milk production of dairy sheep naturally infected by gastrointestinal strongyles. *Veterinary parasitology*, 156(3), 340-345.
109. Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M. P., Utzinger, J. (2010). FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols*, 5(3), 503-515.
110. Cringoli, G., Rinaldi, L., Albonico, M., Bergquist, R., & Utzinger, J. (2013). Geospatial (s) tools: integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. *Geospatial health*, 7(2), 399-404.
111. Cruz, D. G., Silva, C. P., Carneiro, C. N. B., Retamal, C. A., Thiébaud, J. T. L., DaMatta, R. A., & Santos, C. P. (2009). Acid phosphatase activity during the interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* with the nematode *Panagrellus* sp. *Journal of invertebrate pathology*, 102(3), 238-244.
112. Di Loria, A., Veneziano, V., Piantedosi, D., Rinaldi, L., Cortese, L., Mezzino, L., ... & Ciaramella, P. (2009). Evaluation of the FAMACHA system for detecting the severity of anaemia in sheep from southern Italy. *Veterinary parasitology*, 161(1), 53-59.
113. da Silva, A. S., Zanette, R. A., Otto, M. A., Soares, C. D. M., Alves, S. H., Monteiro, S. G., & Santurio, J. M. (2009). *Duddingtonia flagrans*: Centrifugal flotation technique with magnesium sulphate for the quantification and qualification of chlamydospores in sheep faeces. *Experimental parasitology*, 121(2), 187-188.
114. Den Belder, E., Jansen, E. (1994). Capture of plant-parasitic nematodes by an adhesive hyphae forming isolate of *Arthrobotrys oligospora* and some other nematode-trapping fungi. *Nematologica*, 40(1), 423-437.

115. De Rancourt, M., Fois, N., Lavin, M. P., Tchakérian, E., Vallerand, F. (2006). Mediterranean sheep and goats production: An uncertain future. *Small Ruminant Research*, 62(3), 167-179.
116. de Araújo, F. B. (2014). Isolamento, caracterização e eficácia de fungos nematófagos autóctones do Rio Grande do Sul no controle de nematóides gastrintestinais de ovinos. Tese, Universidade Federal De Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Tese
117. Diez-Tascón, C., Keane, O. M., Wilson, T., Zadissa, A., Hyndman, D. L., Baird, D. B., & Crawford, A. M. (2005). Microarray analysis of selection lines from outbred populations to identify genes involved with nematode parasite resistance in sheep. *Physiological genomics*, 21(1), 59-69.
118. Dias, A. S., Araújo, J. V., Campos, A. K., Braga, F. R., & Fonseca, T. A. (2007). Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1245-1252.
119. Dobson, R. J., Barnes, E. H., Birclijin, S. D., & Gill, J. H. (1992). The survival of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in faecal culture as a source of bias in apportioning egg counts to worm species. *International journal for parasitology*, 22(7), 1005-1008.
120. Dobson, R. J., Hosking, B. C., Jacobson, C. L., Cotter, J. L., Besier, R. B., Stein, P. A., & Reid, S. A. (2012). Preserving new anthelmintics: a simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. *Veterinary parasitology*, 186(1), 79-92.
121. Duddington, C. L. (1949). A new predacious species of *Trichothecium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 32(3-4), 284-287.
122. Durand, D. T., Boshoff, H. M., Michael, L. M., Krecek, R. C. (2005). Survey of nematophagous fungi in South Africa. *Onderstepoort journal of veterinary research*, 72(2), 185-187.
123. Durham, P. J. K., & Elliott, D. C. (1976). Experimental *Ostertagia* spp. infection of sheep: development of worm populations and lesions resulting from different dose-levels of larvae. *Veterinary Parasitology*, 2(2), 157-166.
124. Edwards, J. R., Wroth, R., Chaneet, G. D., Besier, R. B., Karlsson, J., Morcombe, P. W., & Roberts, D. (1986). Survey of anthelmintic resistance in Western Australian sheep flocks 1. Prevalence. *Australian veterinary journal*, 63(5), 135-138.
125. Eisler, M. C., Lee, M. R., Tarlton, J. F., Martin, G. B., Beddington, J., Dungait, J. A., ... & Misselbrook, T. (2014). Agriculture: Steps to sustainable livestock. *Nature*, 507(7490), 32.

126. Epe, C., Holst, C., Koopmann, R., Schnieder, T., Larsen, M., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2009). Experiences with *Duddingtonia flagrans* administration to parasitized small ruminants. *Veterinary parasitology*, 159(1), 86-90.
127. Faedo, M., Larsen, M., Dimander, S. O., Yeates, G. W., Höglund, J., & Waller, P. J. (2002). Growth of the fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding feces deposited by cattle or sheep fed the fungus to control nematode parasites. *Biological control*, 23(1), 64-70.
128. Faessler, H., Torgerson, P. R., & Hertzberg, H. (2007). Failure of *Duddingtonia flagrans* to reduce gastrointestinal nematode infections in dairy ewes. *Veterinary parasitology*, 147(1), 96-102.
129. Falzon, L. C., O'Neill, T. J., Menzies, P. I., Peregrine, A. S., Jones-Bitton, A., & Mederos, A. (2014). A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. *Preventive veterinary medicine*, 117(2), 388-402.
130. Falzon, L. C., Menzies, P. I., VanLeeuwen, J., Shakya, K. P., Jones-Bitton, A., Avula, J., ... & Peregrine, A. S. (2014). Pilot project to investigate over-wintering of free-living gastrointestinal nematode larvae of sheep in Ontario, Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 55(8), 749.
131. Falzon, L. C., van Leeuwen, J., Menzies, P. I., Jones-Bitton, A., Sears, W., Jansen, J. T., & Peregrine, A. S. (2015). Erratum to: Comparison of calculation methods used for the determination of anthelmintic resistance in sheep in a temperate continental climate. *Parasitology research*, 114(4), 1631-1643.
132. Fernández, A. S., Larsen, M., Wolstrup, J., Grønvold, J., Nansen, P., & Bjørn, H. (1999). Growth rate and trapping efficacy of nematode-trapping fungi under constant and fluctuating temperatures. *Parasitology research*, 85(8-9), 661-668.
133. Fontenot, M. E., Miller, J. E., Peña, M. T., Larsen, M., & Gillespie, A. (2003). Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. *Veterinary Parasitology*, 118(3), 203-213.
134. Galper, S., Eden, L. M., Stirling, G. R., & Smith, L. J. (1995). Simple screening methods for assessing the predacious activity of nematode-trapping fungi. *Nematologica*, 41(1), 130-1
135. Gardner, K., Wiebe, M. G., Gillespie, A. T., & Trinci, A. P. (2000). Production of chlamydospores of the nematode-trapping *Duddingtonia flagrans* in shake flask culture. *Mycological research*, 104(2), 205-209.
136. Gibson, T. E. (1954). Studies on trichostrongylosis: I. The Pathogenesis of *Trichostrongylus axei* in Sheep maintained on a low Plane of Nutrition. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 64, 127-140.
137. Gómez-Rincón, C., Uriarte, J., & Valderrábano, J. (2006). Efficiency of *Duddingtonia flagrans* against *Trichostrongyle* infections of sheep on mountain pastures. *Veterinary parasitology*, 141(1), 84-90.

138. Gopal, R. M., Sandhu, K. S., & Sidhu, P. K. (2004). Efficacy of abamectin against ivermectin-resistant strain of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Veterinary parasitology*, 121(3), 277-283.
139. Grønvold, J., Nansen, P., Henriksen, S. A., Larsen, M., Wolstrup, J., Bresciani, J., Rawat, H., Friberg, L. (1996). Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *Journal of Helminthology*, 70(04), 291-297.
140. Grønvold, J., Henriksen, S. A., Nansen, P., Wolstrup, J., & Thylin, J. (1989). Attempts to control infection with *Ostertagia ostertagi* (Trichostrongylidae) in grazing calves by adding mycelium of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to cow pats. *Journal of helminthology*, 63(02), 115-126.
141. Grønvold, J., Wolstrup, J., Larsen, M., Gillespie, A., & Giacomazzi, F. (2004). Interspecific competition between the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*, and selected microorganisms and the effect of spore concentration on the efficacy of nematode trapping. *Journal of helminthology*, 78(01), 41-46.
142. Gonzalez Cruz, M. E., Mendoza de Gives, P., Quiroz Romero, H. (1998). Comparison of the trapping ability of *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium geophyropagum* on infective larvae of *Strongyloides papillosus*. *Journal of helminthology*, 72(03), 209-213.
143. Gonzales Garduno, R., Mendoza de Gives, P., Hernández, G. T., Pérez, C. B., Jiménez, E. O., & Mendo, O. H. (2005). Estudio in vitro de la capacidad depredadora de *Duddingtonia flagrans* contra larvas de nematodos gastrointestinales de ovinos de pelo. *Tec Pecu Mex*, 43(3), 405-414.
144. Handbook of Microbiological Culture Media (International edition) 5th Ed. (1999). Scharlau Chemie S.A., Spain, p 250.
145. Himonas, C., & Papadopoulos, E. (1994). Anthelmintic resistance in imported sheep. *Veterinary Record*, 134(17), 456-456.
146. Hughes, P. L., McKenna, P. B., & Dowling, A. F. (2005). A survey of the prevalence of emerging macrocyclic lactone resistance and of benzimidazole resistance in sheep nematodes in the lower North Island of New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 53(1), 87-90.
147. Hughes, P. L., Dowling, A. F., & Callinan, A. P. L. (2007). Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics and associated risk factors on sheep farms in the lower North Island of New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 55(4), 177-183.
148. Hrnjak I, Lukić T, Gavrilov MB, Marković SB, Unkašević M, Tošić I: Aridity in Vojvodina, Serbia. *Theor Appl Climatol* 2014, 115:323–332.
149. Ibragimova, Z. B., Anan'ko, G. G., Kostina, N. E., Teplyakova, T. V., & Mazurkova, N. A. (2015). Toxicity and Antiviral Activity of the Extracts of Submerged Mycelium of Nematophagous *Duddingtonia flagrans* Fungus in Vero Cell Culture. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 160(2), 246-248.

150. Jabbar, A., Campbell, A. J., Charles, J. A., & Gasser, R. B. (2013). First report of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* in alpacas in Australia. *Parasites & vectors*, 6, 243.
151. Jackson, F., & Coop, R. L. (2000). The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, 120(07), 95-107.
152. Jacobs, C. T., & Scholtz, C. H. (2015). A review on the effect of macrocyclic lactones on dung-dwelling insects: Toxicity of macrocyclic lactones to dung beetles. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 82(1), 01-08.
153. Jackson, P. G.G., Cockcroft, P. D., (2002). *Clinical examination of farm animals*. Oxford: Blackwell Science.
154. Johansen, M. V. (1989). An evaluation of techniques used for the detection of anthelmintic resistance in nematode parasites of domestic livestock. *Veterinary Research Communications*, 13(6), 455-466.
155. Jobim, M. B., Santurio, J. M., & De La Rue, M. L. (2008). *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematodeos de bovinos a campo. *Ciencia rural*, 38(8), 2256-2263.
156. Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in parasitology*, 20(10), 477-481.
157. Kaplan, R. M., Burke, J. M., Terrill, T. H., Miller, J. E., Getz, W. R., Mobini, S., ... & Vatta, A. F. (2004). Validation of the FAMACHA® eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States. *Veterinary parasitology*, 123(1), 105-120.
158. Kelly, P., Good, B., Hanrahan, J. P., Fitzpatrick, R., & de Waal, T. (2009). Screening for the presence of nematophagous fungi collected from Irish sheep pastures. *Veterinary parasitology*, 165(3), 345-349.
159. Kenyon, F., McBean, D., Greer, A. W., Burgess, C. G., Morrison, A. A., Bartley, D. J., Bartley, Y., Devin, L., Nath, M., Jackson, F. (2013). A comparative study of the effects of four treatment regimes on ivermectin efficacy, body weight and pasture contamination in lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes in Scotland. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 3, 77-84.
160. Kenyon, F., Rinaldi, L., McBean, D., Pepe, P., Bosco, A., Melville, L., & Vercruysse, J. (2016). Pooling sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and *Nematodirus* infection. *Veterinary Parasitology*, 225, 53-60,
161. Khadijah, S., Kahn, L. P., Walkden-Brown, S. W., Bailey, J. N., & Bowers, S. F. (2013). Soil moisture influences the development of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* to third stage larvae. *Veterinary parasitology*, 196(1), 161-171.

162. Knapp-Lawitzke, F., Küchenmeister, F., Küchenmeister, K., von Samson-Himmelstjerna, G., & Demeler, J. (2014). Assessment of the impact of plant species composition and drought stress on survival of strongylid third-stage larvae in a greenhouse experiment. *Parasitology research*, 113(11), 4123-4131.
163. Knapp-Lawitzke, F., von Samson-Himmelstjerna, G., & Demeler, J. (2016). Elevated temperatures and long drought periods have a negative impact on survival and fitness of strongylid third stage larvae. *International journal for parasitology*, 46(4), 229-237.
164. Koopmann R (2007) Ist die FAMACHA-Eye-Colour-Karte zur klinischen Diagnose von *Haemonchus contortus*-Befall bei Schafen und Ziegen in Norddeutschland geeignet? In: Zikeli S, Claupein W, Dabbert S (eds) Beiträge zur 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau "Zwischen Tradition und Globalisierung" : Universität Hohenheim, 20.-23. März 2007 ; Bd. 2. Berlin: Köster, pp 669-672
165. Kulišić Z, Aleksić N, Đorđević M, Gajić B, Tambur Z, Stevanović J, Stanimirović Z (2013). Prevalence of gastrointestinal nematodes in sheep in Eastern Serbia. *Acta Veterinaria*, 63(4), 429-436
166. Lapage G, 1956, *Veterinary parasitology*, Edinmurgh, Tweeddale Court
167. Larsen, M., Wolstrup, J., Henriksen, S. A., Grønvold, J., & Nansen, P. (1992). In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *Journal of helminthology*, 66(02), 137-141.
168. Larsen, M., Faedo, M., & Waller, P. J. (1994). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: survey for the presence of fungi in fresh faeces of grazing livestock in Australia. *Veterinary parasitology*, 53(3), 275-281.
169. Larsen, M., Nansen, P., Wolstrup, J., Grønvold, J., Henriksen, S. A., & Zorn, A. (1995). Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. *Veterinary Parasitology*, 60(3), 321-330.
170. Larsen, M., Nansen, P., Grøndahl, C., Thamsborg, S. M., Grønvold, J., Wolstrup, J., & Monrad, J. (1996). The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. *Parasitology*, 113(01), 1-6.
171. Larsen, M., Nansen, P., Grønvold, J., Wolstrup, J., & Henriksen, S. A. (1997). Biological control of gastro-intestinal nematodes—facts, future, or fiction? *Veterinary parasitology*, 72(3), 479-492.
172. Larsen, M., Faedo, M., Waller, P. J., & Hennessy, D. R. (1998). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: studies with *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*, 76(1), 121-128.
173. Larsen, M., Wolstrup, J., Henriksen, S. A., Dackman, C., Grønvold, J., & Nansen, P. (1991). In vitro stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. *Journal of Helminthology*, 65(03), 193-200.

174. Leathwick, D. M., & Besier, R. B. (2014). The management of anthelmintic resistance in grazing ruminants in Australasia—strategies and experiences. *Veterinary Parasitology*, 204(1), 44-54.
175. Leathwick, D. M., Ganesh, S., & Waghorn, T. S. (2015). Evidence for reversion towards anthelmintic susceptibility in *Teladorsagia circumcincta* in response to resistance management programmes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(1), 9-15.
176. Levecke, B., Rinaldi, L., Charlier, J., Maurelli, M. P., Bosco, A., Vercruysse, J., & Cringoli, G. (2012). The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. *Veterinary parasitology*, 188(1), 194-199.
177. Levecke, B., Dobson, R. J., Speybroeck, N., Vercruysse, J., & Charlier, J. (2012 a). Novel insights in the faecal egg count reduction test for monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes of veterinary importance. *Veterinary parasitology*, 188(3), 391-396.
178. Little, P. R., Hodge, A., Watson, T. G., Seed, J. A., & Maeder, S. J. (2010). Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel-abamectin, in sheep in New Zealand. *New Zealand veterinary journal*, 58(3), 121-129.
179. Llerandi-Juárez, R. D., & Mendoza-de Gives, P. (1998). Resistance of chlamydospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep in Mexico. *Journal of Helminthology*, 72(02), 155-158.
180. Luz, C., Netto, M. C. B., & Rocha, L. F. N. (2007). In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate-pathogenic and saprobic fungi. *Mycopathologia*, 164(1), 39-47.
181. Lyndal-Murphy, M., Swain, A. J., & Pepper, P. M. (2014). Methods to determine resistance to anthelmintics when continuing larval development occurs. *Veterinary parasitology*, 199(3), 191-200.
182. Maciel, A. S., Araújo, J. V., Campos, A. K., Benjamin, L. A., & Freitas, L. G. (2009). Scanning electron microscopy of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae captured and destroyed by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Micron*, 40(4), 463-470.
183. MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food): Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques, ADAS, HMSO, UK, 1986.
184. Mahieu, M., & Aumont, G. (2009). Effects of sheep and cattle alternate grazing on sheep parasitism and production. *Tropical animal health and production*, 41(2), 229-239.
185. Mahieu, M., Ferré, B., Madassamy, M., & Mandonnet, N. (2014). Fifteen years later, anthelmintic resistances have dramatically spread over goat farms in Guadeloupe. *Veterinary parasitology*, 205(1), 379-384.

186. Mahoney, C. J., & Strongman, D. B. (1994). Nematophagous fungi from cattle manure in four states of decomposition at three sites in Nova Scotia, Canada. *Mycologia*, 86(3), 371-375.
187. Malan, F. S., Van Wyk, J. A., & Wessels, C. D. (2001). Clinical evaluation of anaemia in sheep: early trials. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 68(3), 165.
188. Manuelli, P. R., Waller, P. J., Faedo, M., & Mahommed, F. (1999). Biological control of nematode parasites of livestock in Fiji: screening of fresh dung of small ruminants for the presence of nematophagous fungi. *Veterinary parasitology*, 81(1), 39-45.
189. Martin, P. J., Le Jambre, L. F., & Claxton, J. H. (1981). The impact of refugia on the development of thiabendazole resistance in *Haemonchus contortus*. *International journal for parasitology*, 11(1), 35-41.
190. Martin, P. J., Anderson, N., & Jarrett, R. G. (1985). Resistance to benzimidazole anthelmintics in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 62(2), 38-43.
191. Martin, P. J., Anderson, N., Jarrett, R. G. (1989). Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Australian Veterinary Journal*, 66(8), 236-240.
192. McKellar, Q. A., & Gokbulut, C. (2012). Pharmacokinetic features of the antiparasitic macrocyclic lactones. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(6), 888-911.
193. McKenna, P. B. (1981). The diagnostic value and interpretation of faecal egg counts in sheep. *New Zealand veterinary journal*, 29(8), 129-132.
194. McKenna, P. B. (1998). The effect of previous cold storage on the subsequent recovery of infective third stage nematode larvae from sheep faeces. *Veterinary parasitology*, 80(2), 167-172.
195. McKenna, P. B. (1996). Potential limitations of the undifferentiated faecal egg count reduction test for the detection of anthelmintic resistance in sheep. *New Zealand Veterinary Journal*, 44(2), 73-75.
196. McKenna, P. B. (2006). A comparison of faecal egg count reduction test procedures. *New Zealand Veterinary Journal*, 54(4), 202-203.
197. McKenna, P. B. (2006 a). Further comparison of faecal egg count reduction test procedures: sensitivity and specificity. *New Zealand Veterinary Journal*, 54(6), 365-366.
198. McKenna, P. B. (2008). Comparison of two worm counting procedures for the enumeration of abomasal and small intestinal nematode parasites of sheep. *Veterinary parasitology*, 157(3), 254-259.
199. McKenna, P. B. (2013). Are multiple pre-treatment groups necessary or unwarranted in faecal egg count reduction tests in sheep?. *Veterinary parasitology*, 196(3), 433-437.

200. McLeod, R. S. (1995). Costs of major parasites to the Australian livestock industries. *International Journal for Parasitology*, 25(11), 1363-1367.
201. McNally, J., Callan, D., Andronicos, N., Bott, N., & Hunt, P. W. (2013). DNA-based methodology for the quantification of gastrointestinal nematode eggs in sheep faeces. *Veterinary parasitology*, 198(3), 325-335.
202. Mendoza-De Gives, P., Vazquez-Prats, V. M. (1994). Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. *Veterinary parasitology*, 55(3), 197-203.
203. Mendoza-De Gives, P., Davies, K. G., Clark, S. J., & Behnke, J. M. (1999). Predatory behaviour of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitology*, 119(01), 95-104.
204. Mendoza-De Gives, P., Zapata Nieto, C., Liebano Hernandez, E., Lopez Arellano, M. E., Rodríguez, D. H., & Garduño, R. G. (2006). Biological control of gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081(1), 355-359.
205. Meeusen, E. N., Balic, A., & Bowles, V. (2005). Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(1), 121-125.
206. Meyer, W. J., & Wiebe, M. G. (2003). Enzyme production by the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*. *Biotechnology letters*, 25(10), 791-795.
207. Middelberg, A., & McKenna, P. B. (1983). Oxfendazole resistance in *Nematodirus spathiger*. *New Zealand veterinary journal*, 31(5), 65-66.
208. Molento, M. B., Gavião, A. A., Depner, R. A., & Pires, C. C. (2009). Frequency of treatment and production performance using the FAMACHA method compared with preventive control in ewes. *Veterinary parasitology*, 162(3), 314-319.
209. Miller, C. M., Waghorn, T. S., Leathwick, D. M., & Gilmour, M. L. (2006). How repeatable is a faecal egg count reduction test? *New Zealand Veterinary Journal*, 54(6), 323-328.
210. Miller, C. M., Waghorn, T. S., Leathwick, D. M., Candy, P. M., Oliver, A. B., & Watson, T. G. (2012). The production cost of anthelmintic resistance in lambs. *Veterinary parasitology*, 186(3), 376-381.
211. Mitchell, S., Mearns, R., Richards, I., Donnan, A. A., Bartley, D. J., (2011). Benzimidazole resistance in *Nematodirus battus*. *Veterinary Record* 168, 623-624.
212. Morrison, A. A., Mitchell, S., Mearns, R., Richards, I., Matthews, J. B., & Bartley, D. J. (2014). Phenotypic and genotypic analysis of benzimidazole resistance in the ovine parasite *Nematodirus battus*. *Veterinary research*, 45(1), 1.

213. Moors, E., & Gauly, M. (2009). Is the FAMACHA® chart suitable for every breed? Correlations between FAMACHA® scores and different traits of mucosa colour in naturally parasite infected sheep breeds. *Veterinary parasitology*, 166(1), 108-111.
214. Morgan, M., Behnke, J. M., Lucas, J. A., & Peberdy, J. F. (1997). In vitro assessment of the influence of nutrition, temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megalosporum*. *Parasitology*, 115(03), 303-310.
215. Morgan, E. R., & Van Dijk, J. (2012). Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Veterinary parasitology*, 189(1), 8-14.
216. Mederos, A., Kelton, D., Peregrine, A. S., VanLeeuwen, J., Fernández, S., LeBoeuf, A., ... & Martin, R. (2014). Evaluation of the utility of subjective clinical parameters for estimating fecal egg counts and packed cell volume in Canadian sheep flocks. *Veterinary parasitology*, 205(3), 568-574.
217. Murphy, A. (2001). Re: Ivermectin-resistant *Ostertagia circumcincta* from sheep in the lower North Island and their susceptibility to other macrocyclic lactone anthelmintics. *New Zealand Veterinary Journal* 49(3), 2001
218. Nansen, P., Grønvold, J., Henriksen, S. A., & Wolstrup, J. (1986). Predacious activity of the nematode-destroying fungus, *Arthrobotrys oligospora*, on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematodes. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 53(2), 237-243.
219. Nansen, P., Larsen, M., Roepstorff, A., Grønvold, J., Wolstrup, J., & Henriksen, S. A. (1996). Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrongylus rubidus* in outdoor-reared pigs by daily feeding with the microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Parasitology research*, 82(7), 580-584
220. Newton, S. A., & Munn, E. A. (1999). The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today*, 15(3), 116-122.
221. Nisbet, A. J., McNeilly, T. N., Wildblood, L. A., Morrison, A. A., Bartley, D. J., Bartley, Y., & Matthews, J. B. (2013). Successful immunization against a parasitic nematode by vaccination with recombinant proteins. *Vaccine*, 31(37), 4017-4023
222. Niżnikowski, R., Strzelec, E., Popielarczyk, D. (2006). Economics and profitability of sheep and goat production under new support regimes and market conditions in Central and Eastern Europe. *Small Ruminant Research*, 62(3), 159-165.
223. Nordbring-Hertz, B. (1968). The influence of medium composition and additions of animal origin on the formation of capture organs in *Arthrobotrys oligospora*. *Physiologia Plantarum*, 21(1), 52-65.
224. Nordbring-Hertz, B. (1977). Nematode-induced morphogenesis in the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Nematologica*, 23(4), 443-451.

225. Nwosu, C.O., Madu, P.P., Richards, W.S., Preevalence and seasonal changes in the population of gastrointestinal parasites of small ruminants in the semi-arid zone of north-eastern Nigeria. *Veterinary Parasitology*, 144(1-2)118-124, 2007.
226. Obendorf, D. L., Parsons, J., & Nicholls, J. (1986). An egg development test for the evaluation of benzimidazole resistance in *Nematodirus spathiger*. *Australian veterinary journal*, 63(11), 382-383.
227. Obendorf, D. L., Nicholls, J., Koen, T., & Lacey, E. (1991). Benzimidazole-resistant *Nematodirus* sp in Tasmania. *Australian veterinary journal*, 68(2), 72-73.
228. O'Connor, L. J., Walkden-Brown, S. W., & Kahn, L. P. (2006). Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary parasitology*, 142(1), 1-15.
229. Ojeda-Robertos, F. Nadaia, de Gives, P.M., Torres-Acosta, J.F.J., Rodrigueus-Vivas, R.I., Aguillar-Cabbalero, A.J.: Evaluating the effectiveness of a Mexican strain of *Duddingtonia flagrans* as a biological control agent against gastrointestinal nematodes in goat faeces. *J. Helminthol.*, 79:151-157, 2005.
230. Ojeda-Robertos, N. F., Torres-Acosta, J. F. J., Ayala-Burgos, A., Aguilar-Caballero, A. J., Cob-Galera, L. A., & Mendoza-de-Gives, P. (2008). A technique for the quantification of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in sheep faeces. *Veterinary parasitology*, 152(3), 339-343.
231. Ojeda-Robertos, N. F., de Jesus Torres-Acosta, J. F., Aguilar-Caballero, A. J., Ayala-Burgos, A., Cob-Galera, L. A., Sandoval-Castro, C. A., ... & de Gives, P. M. (2008a). Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary parasitology*, 158(4), 329-335.
232. Ojeda-Robertos, N. F., Torres-Acosta, J. F., Ayala-Burgos, A. J., Sandoval-Castro, C. A., Valero-Coss, R. O., & Mendoza-de-Gives, P. (2009). Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: in vitro and in vivo studies. *BMC veterinary research*, 5(1), 1.
233. Ojeda-Robertos, F. Nadaia, de Gives, P.M., Torres-Acosta, J.F.J., Ayala-Burgos, A., Cabbalero, A.J., Cob-Galera, L.A., De Gives, P.M.: A technique for the quantification of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in sheep faeces. *Vet. Parasitol.*, 152:339-343, 2008.
234. Ojeda-Robertos, F. Nadaia, de Gives, P.M., Torres-Acosta, J.F.J., Ayala-Burgos, A., Cabbalero, A.J., Cob-Galera, L.A., De Gives, P.M. Assesing the efficacy of *Dudingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Vet. Parasitol.*, 158:329-335, 2008a.
235. Ojeda-Robertos, N. F., de Jesús Torres-Acosta, J. F., Mendoza-de-Gives, P., Gonzalez-Garduño, R., Valero-Coss, R. O., Liébano-Hernández, E., & Ayala-Burgos, A. (2015). Optimizing the use of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores against *Haemonchus contortus* in feces of sheep. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 18(3), 259-265

236. Oliver, A. M. B., Pomroy, W. E., & Leathwick, D. M. (2016). Benzimidazole resistance in *Nematodirus spathiger* and *N. filicollis* in New Zealand. *New Zealand veterinary journal*, 1-6.
237. Pandit, R. J. (2014). Molecular characterization of nematophagous fungi-A potential bio-control agent, Thesis, University Vallabh Vidyanagar.
238. Paraud, C., & Chartier, C. (2003). Biological control of infective larvae of a gastro-intestinal nematode (*Teladorsagia circumcincta*) and a small lungworm (*Muellerius capillaris*) by *Duddingtonia flagrans* in goat faeces. *Parasitology research*, 89(2), 102-106.
239. Paraud, C., Cabaret, J., Pors, I., & Chartier, C. (2005). Impact of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Muellerius capillaris* larvae in goat faeces. *Veterinary parasitology*, 131(1), 71-78.
240. Paraud, C., Hoste, H., Lefrileux, Y., Pommaret, A., Paolini, V., Pors, I., & Chartier, C. (2005a). Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials. *Veterinary Research*, 36(2), 157-166.
241. Paraud, C., Pors, I., Chicard, C., & Chartier, C. (2006). Comparative efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in goat faeces: influence of the duration and of the temperature of coproculture. *Parasitology research*, 98(3), 207-213.
242. Paraud, C., Pors, I., & Chartier, C. (2007). Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to control nematode parasites of first-season grazing goats in France. *Veterinary research communications*, 31(3), 305-315.
243. Paraud, C., Lumaret, J. P., & Chartier, C. (2007 a). Lack of effect of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on the development of the dung beetle, *Aphodius constans*. *Small Ruminant Research*, 70(2), 276-279.
244. Paraud, C., Marcotty, T., Lespine, A., Sutra, J. F., Pors, I., & Devos, I. (2016). Cross-resistance to moxidectin and ivermectin on a meat sheep farm in France. *Veterinary Parasitology*, 226, 88-92.
245. Pavlicevic, A., Pavlovic, I., Stajkovic, N., & Paesic, B. (2016). Evidence for resistance to carbaryl in poultry red mites from the Republic of Serbia and Montenegro. *Animal Science and Biotechnologies*, 49(1), 222-225.
246. Pavlović I., Ivanović S., Žujović M., Jakšić., D., Dobrila (2003). Uticaj parazitskih infekcija na količinu izlučenog mleka ovaca, *Savremena poljoprivreda*, 52 (3-4), 489-490.
247. Pavlović, I., Ivanović, S., Žugić, G., Jovčić, D., Bojkovski, J., & Pajić, M. (2012). Season distribution of gastrointestinal helminths of small ruminants in spread Belgrade area. *Lucrări Ştiinţifice Medicină Veterinară Timişoara*, 45(3), 155-160.

248. Patel, D., Pandit, R., Kunjadia, A. (2015). Isolation and Molecular Characterization of Indian Isolates of Nematode Trapping Fungi. *International Journal of Tropical Agriculture*, 33(3), 2349-2359.
249. Patten, T., Good, B., Hanrahan, J. P., Mulcahy, G., & de Waal, T. (2011). Gastrointestinal nematode control practices on lowland sheep farms in Ireland with reference to selection for anthelmintic resistance. *Irish veterinary journal*, 64(1), 1.
250. Papadopoulos, E., Gallidis, E., & Ptochos, S. (2012). Anthelmintic resistance in sheep in Europe: a selected review. *Veterinary parasitology*, 189(1), 85-88.
251. Papadopoulos, E., Gallidis, E., Ptochos, S., & Fthenakis, G. C. (2013). Evaluation of the FAMACHA© system for targeted selective anthelmintic treatments for potential use in small ruminants in Greece. *Small Ruminant Research*, 110(2), 124-127.
252. Paz-Silva, A., Francisco, I., Valero-Coss, R. O., Cortiñas, F. J., Sánchez, J. A., Francisco, R., Arias, M., Suárez, J. L., López-Arellano, M. E., Sánchez-Andrade, R., Mendoza de Gives, P. (2011). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Veterinary parasitology*, 179(1), 277-282.
253. Pedreira, J., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Suarez, J. L., Arias, M., Lomba, C., & Morrondo, P. (2006). Prevalences of gastrointestinal parasites in sheep and parasite-control practices in NW Spain. *Preventive veterinary medicine*, 75(1), 56-62.
254. Peña, M. T., Miller, J. E., Fontenot, M. E., Gillespie, A., & Larsen, M. (2002). Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. *Veterinary Parasitology*, 103(3), 259-265.
255. Powers, K. G., Wood, I. B., Eckert, J., Gibson, T., & Smith, H. J. (1982). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). *Veterinary parasitology*, 10(4), 265-284.
256. Petrie, A., Watson, P.: *Statistics for Veterinary and Animal Science*, 2nd ed., Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp.166-167, 2006.
257. Petz, B. (2007). *Osnovne statističke metode za nematematičare*. Naklada Slap, Jastrebarsko.
258. Pivoto, F. L., Machado, F. A., Anezi-Junior, P. A., Weber, A., Cezar, A. S., Sangioni, L. A., & Vogel, F. S. F. (2014). Improving liveweight gain of lambs infected by multidrug-resistant nematodes using a FECRT-based schedule of treatments. *Parasitology research*, 113(6), 2303-2310.
259. Ransom, B. H. (1911). *The nematodes parasitic in the alimentary tract of cattle, sheep, and other ruminants* (No. 127). US Government Printing Office.
260. Rapić, D., Džakula, N., Žuković, M. (1985). Djelotvornost ivermektina protiv znatnijih parazita ovaca. *Praxis Veterinaria* 33(1-2), 177-180.

261. Rinaldi, L., Morgan, E. R., Bosco, A., Coles, G. C., & Cringoli, G. (2014). The maintenance of anthelmintic efficacy in sheep in a Mediterranean climate. *Veterinary parasitology*, 203(1), 139-143.
262. Riviere, J. E., Papich, M. G. (Eds.). (2009). *Veterinary pharmacology and therapeutics*, 9th ed. John Wiley & Sons.
263. Roberts, F. H. S., & O'sullivan, P. J. (1950). Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Crop and Pasture Science*, 1(1), 99-102.
264. Robertson, T. G., & Elliott, D. C. (1966). The laboratory assessment of worm parasite populations in sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 9(2), 350-358.
265. Rocha, R. A., Araújo, J. V., & Amarante, A. F. T. (2007). Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against infections by *Haemonchus* and *Trichostrongylus* species in lambs at pasture. *Journal of helminthology*, 81(04), 387-392.
266. Roeber, F., Jex, A. R., Campbell, A. J., Campbell, B. E., Anderson, G. A., & Gasser, R. B. (2011). Evaluation and application of a molecular method to assess the composition of strongylid nematode populations in sheep with naturally acquired infections. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 849-854.
267. Rose, H., Rinaldi, L., Bosco, A., Mavrot, F., de Waal, T., Skuce, P., ... & Vercruysse, J. (2015). Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Vet Rec*, 176(21), 546.
268. Rózsa, L., Reiczigel, J., & Majoros, G. (2000). Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology*, 86(2), 228-232.
269. Rosenzweig, W. D. (1984). Role of amino acids, peptides, and medium composition in trap formation by nematode-trapping fungi. *Canadian journal of microbiology*, 30(2), 265-267.
270. Santurio, J. M., Zanette, R. A., Da Silva, A. S., Mario, L., Monteiro, S. G., & Alves, S. H. (2009). Improved method for *Duddingtonia flagrans* chlamydospores production for livestock use. *Veterinary parasitology*, 164(2), 344-346.
271. Santurio, J. M., Zanette, R. A., Da Silva, A. S., Fanfa, V. R., Farret, M. H., Ragagnin, L., ... & Monteiro, S. G. (2011). A suitable model for the utilization of *Duddingtonia flagrans* fungus in small-flock-size sheep farms. *Experimental parasitology*, 127(4), 727-731.
272. Sankhyan, S. K., Shinde, A. K., Bhatta, R., & Karim, S. A. (1999). Comparison of diet and faecal collection methods for assessment of seasonal variation in dry matter intake by sheep maintained on a *Cenchrus ciliaris* pasture. *Animal feed science and technology*, 82(3), 261-269.
273. Santos, C. D. P., Saumell, C. A., Padilha, T., & Larsen, M. (1998). Nematophagous fungi in decomposing ruminant and equine feces in Brazil. In: International Conference:

- novel approaches to the control of helminth parasites of livestock, 1998, Baton Rouge, La.
274. Sanyal, P. K. (2000). Screening for Indian isolates of predacious fungi for use in biological control against nematode parasites of ruminants. *Veterinary research communications*, 24(1), 55-62.
275. Sanyal, P. K., & Mukhopadhyaya, P. N. (2003). Top dressing of feed with desiccated chlamydospores of *Duddingtonia flagrans* for biological control of the pre-parasitic stages of ovine *Haemonchus contortus*. *Veterinary research communications*, 27(5), 381-390.
276. Sanyal, P. K. (2004). Density dependent nematophagous behaviour of *Duddingtonia flagrans*. *Indian veterinary journal*, 81(1), 16-19.
277. Sanyal, P. K., Sarkar, A. K., Patel, N. K., Mandal, S. C., & Pal, S. (2008). Formulation of a strategy for the application of *Duddingtonia flagrans* to control caprine parasitic gastroenteritis. *Journal of helminthology*, 82(02), 169-174.
278. Sargison, N. D., Jackson, F., Bartley, D. J., & Moir, A. C. P. (2005). Failure of moxidectin to control benzimidazole-, levamisole- and ivermectin-resistant *Teladorsagia circumcincta* in a sheep flock. *Veterinary Record: Journal of the British Veterinary Association*, 156(4).
279. Sargison, N. (2009). *Sheep flock health: a planned approach*. John Wiley & Sons.
280. Sargison, N. D. (2011). Pharmaceutical control of endoparasitic helminth infections in sheep. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27(1), 139-156.
281. Sargison, N. D. (2012). Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of sheep—Future of anthelmintic drugs. *Veterinary parasitology*, 189(1), 79-84.
282. Saumell, C. A., Fernández, A. S., Fusé, L. A., Rodríguez, M., Sagüés, M. F., & Iglesias, L. E. (2015). Nematophagous fungi from decomposing cattle faeces in Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(4), 252-256.
283. Schnyder, M., Torgerson, P. R., Schönmann, M., Kohler, L., & Hertzberg, H. (2005). Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. *Veterinary parasitology*, 128(3), 285-290.
284. Scheuerle, M., Mahling, M., Muntwyler, J., & Pfister, K. (2010). The accuracy of the FAMACHA©-method in detecting anaemia and haemonchosis in goat flocks in Switzerland under field conditions. *Veterinary parasitology*, 170(1), 71-77.
285. Scholler, M., Hagedorn, G., & Rubner, A. (1999). A reevaluation of predatory orbiliaceous fungi. II. A new generic concept. *Sydowia*, 51(1), 89-113.
286. Scott, P. (2013): *Sheep medicine*, 3 rd ed, Manson Publishing, UK

287. Shams Ghahfarokhi, M., Razzaghi Abyaneh, M., Ranjbar Bahadori, S., Eslami, A., Zare, R., & Ebrahimi, M. (2004). Screening of soil and sheep faecal samples for predacious fungi: isolation and characterization of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Iranian Biomedical Journal*, 8(3), 135-142.
288. Sotomaior, C. S., Rosalinski-Moraes, F., da Costa, A. R. B., Maia, D., Monteiro, A. L. G., & van Wyk, J. A. (2012). Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in Suffolk sheep and crossbred Boer goats. *Veterinary parasitology*, 190(1), 114-119.
289. Silva, A. R., Araújo, J. V., Braga, F. R., Frassy, L. N., Tavela, A. O., Carvalho, R. O., & Castejon, F. V. (2009). Biological control of sheep gastrointestinal nematodiasis in a tropical region of the southeast of Brazil with the nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium*. *Parasitology research*, 105(6), 1707-1713.
290. Silva, B. F., Carrijo-Mauad, J. R., Braga, F. R., Campos, A. K., Araújo, J. V., & Amarante, A. F. (2010). Efficacy of *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotrys robusta* in controlling sheep parasitic gastroenteritis. *Parasitology research*, 106(6), 1343-1350.
291. Silva, M. E., Araújo, J. V., Braga, F. R., Freitas Soares, F. E., Rodrigues, D. S. (2013). Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes in heifers using different isolates of nematophagous fungi. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(1), 78-83.
292. Silvestre, A., Leignel, V., Berrag, B., Gasnier, N., Humbert, J. F., Chartier, C., & Cabaret, J. (2002). Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Veterinary research*, 33(5), 465-480.
293. Smith, D. (2014). Barbevax: the first commercially available subunit vaccine for a nematode parasite. Moredun Research Institute, Edinburgh.
294. Skipp, R. A., Yeates, G. W., Chen, L. Y., & Glare, T. R. (2002). Occurrence, morphological characteristics and ribotyping of New Zealand isolates of *Duddingtonia flagrans*, a candidate for biocontrol of animal parasitic nematodes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 45(3), 187-196.
295. Soder, K. J., & Holden, L. A. (2005). Use of nematode-trapping fungi as a biological control in grazing livestock. *The professional animal scientist*, 21(1), 30-37.
296. Sutherland, I., & Scott, I. (2010). *Gastrointestinal nematodes of sheep and cattle: biology and control*. John Wiley & Sons, LTD
297. Sutherland, I. A., Bailey, J., & Shaw, R. J. (2010). The production costs of anthelmintic resistance in sheep managed within a monthly preventive drench program. *Veterinary parasitology*, 171(3), 300-304.
298. Taylor, M.A., Coop, R.M., Wall, R.: *Veterinary Parasitology*, 3rd ed. Blackwell Publishing, Oxford, 2007.
299. Taylor, M. A. (2010). Parasitological examinations in sheep health management. *Small ruminant research*, 92(1), 120-125.

300. Theodoropoulos, G., Theodoropoulos, H., Zervas, G., & Bartzioakas, E. (2000). Nematode parasite control practices of sheep and goat farmers in the region of Trikala, Greece. *Journal of helminthology*, 74(01), 89-93.
301. Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.J. (1979). Diagnosing helminthiasis through coprological examination. Janssen research foundation Beerse, Belgium.
302. Terril, T.H., Larsen, M., Samples, O., Hausted, S., Miller, J.E., Kaplan, R.M., Gelaye, S.: Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat feces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. *Vet. Parasitol.*, 120:285-296, 2004.
303. Torgerson, P. R., Paul, M., & Lewis, F. I. (2012). The contribution of simple random sampling to observed variations in faecal egg counts. *Veterinary parasitology*, 188(3), 397-401.
304. Traversa, D., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2016). Anthelmintic resistance in sheep gastro-intestinal strongyles in Europe. *Small Ruminant Research*, 135, 75-80.
305. Vadlejch, J., Kopecký, O., Kudrnáčová, M., Čadková, Z., Jankovská, I., & Langrová, I. (2014). The effect of risk factors of sheep flock management practices on the development of anthelmintic resistance in the Czech Republic. *Small Ruminant Research*, 117(2), 183-190.
306. Van Dijk, J., & Morgan, E. R. (2009). Hatching behaviour of *Nematodirus filicollis* in a flock co-infected with *Nematodirus battus*. *Parasitology*, 136(07), 805-811.
307. van Dijk, J., De Louw, M. D. E., Kalis, L. P. A., & Morgan, E. R. (2009). Ultraviolet light increases mortality of nematode larvae and can explain patterns of larval availability at pasture. *International journal for parasitology*, 39(10), 1151-1156.
308. Van Wyk, J. A., Malan, F. S., Van Rensburg, L. J., Oberem, P. T., & Allan, M. J. (1997). Quality control in generic anthelmintics: is it adequate?. *Veterinary parasitology*, 72(2), 157-165.
309. Van Wyk, J. A., Stenson, M. O., Van der Merwe, J. S., Vorster, R. J., & Viljoen, P. G. (1999). Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 66(4), 273.
310. Van Wyk, J. A. (2001). Refugia--overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 68(1), 55.
311. Van Wyk, J. A., & Bath, G. F. (2002). The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary research*, 33(5), 509-529.

312. Van Wyk, J.A., Cabaret, J., Michael, L.M., 2004. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Vet. Parasitol.* 119, 277-306.
313. Van Wyk, J. A. (2008). Production trials involving use of the FAMACHA© system for haemonchosis in sheep: preliminary results. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 75(4), 331-345.
314. Van Wyk, J. A., & Mayhew, E. (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 80(1), 00-00.
315. Varady, M., Praslicka, J., Corba, J., & Vesely, L. (1993). Multiple anthelmintic resistance of nematodes in imported goats. *Veterinary Record*, 132(15), 387-388.
316. Vatta, A. F., Letty, B. A., Van der Linde, M. J., Van Wijk, E. F., Hansen, J. W., & Krecek, R. C. (2001). Testing for clinical anaemia caused by *Haemonchus* spp. in goats farmed under resource-poor conditions in South Africa using an eye colour chart developed for sheep. *Veterinary Parasitology*, 99(1), 1-14.
317. Vercruysse, J., & Rew, R. S. (Eds.). (2002). *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. CABI.
318. Vilela, V. L. R., Feitosa, T. F., Braga, F. R., de Araújo, J. V., de Oliveira Souto, D. V., da Silva Santos, H. E., ... & Athayde, A. C. R. (2012). Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the northeastern Brazil. *Veterinary parasitology*, 188(1), 127-133.
319. Virat, M. (1977). Sûr deux hyphomycetes predateurs de nematodes isoles de prairie et notes sûr les genres *Candelabrella* et *Duddingtonia*. *Revue de mycologie*, 41(3), 415-426.
320. Voigt, K., Scheuerle, M., & Hamel, D. (2012). Triple anthelmintic resistance in *Trichostrongylus* spp. in a German sheep flock. *Small Ruminant Research*, 106(1), 30-32.
321. Zajac, A.M., Conboy, G.A. *Veterinary clinical parasitology*. Oxford: Blackwell Publishing; 2006.
322. Zhang, K. Q., & Hyde, K. D. (Eds.). (2014). *Nematode-trapping fungi* (Vol. 23). Springer Science & Business.
323. Waghorn, T. S., Leathwick, D. M., Chen, L. Y., & Skipp, R. A. (2003). Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against three species of gastrointestinal nematodes in laboratory faecal cultures from sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 118(3), 227-234.
324. Waghorn, T. S., Leathwick, D. M., Rhodes, A. P., Lawrence, K. E., Jackson, R., Pomroy, W. E., & Moffat, J. R. (2006). Prevalence of anthelmintic resistance on sheep farms in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 54(6), 271-277.
325. Waghorn, T. S., Leathwick, D. M., Miller, C. M., & Atkinson, D. S. (2008). Brave or gullible: testing the concept that leaving susceptible parasites in refugia will slow the

- development of anthelmintic resistance. *New Zealand Veterinary Journal*, 56(4), 158-163.
326. Waghorn, T. S., Knight, J. S., & Leathwick, D. M. (2014). The distribution and anthelmintic resistance status of *Trichostrongylus colubriformis*, *T. vitrinus* and *T. axei* in lambs in New Zealand. *New Zealand veterinary journal*, 62(3), 152-159.
327. Wall, R., & Beynon, S. (2012). Area-wide impact of macrocyclic lactone parasiticides in cattle dung. *Medical and veterinary entomology*, 26(1), 1-8.
328. Waller, P. J., Faedo, M. (1993). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: screening studies. *Veterinary Parasitology*, 49(2-4), 285-297.
329. Waller, P. J. (1999). International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *International journal for parasitology*, 29(1), 155-164.
330. Wang, B. B., Liu, W., Chen, M. Y., Li, X., Han, Y., Xu, Q., & Liu, J. L. (2015). Isolation and Characterization of China Isolates of *Duddingtonia flagrans*, a Candidate of the Nematophagous Fungi for Biocontrol of Animal Parasitic Nematodes. *The Journal of parasitology*, 101(4), 476-484.
331. West, D.M., Pomroy, W.E., Kenyon, P.R., Morris, S.T., Smith, S.L., Burnham, D.L.: Estimating the cost of subclinical parasitism in grazing ewes. *Small Rumin. Res.*, 86: 84-86, 2009.
332. Whelan, N. C., Charleston, W. A. G., Alexander, A. M., & Lees, S. (1995). Efficacy of ivermectin against benzimidazole-resistant *Nematodirus spathiger* in sheep. *New Zealand veterinary journal*, 43(3), 99-100.
333. Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., & Sangster, N. C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in parasitology*, 20(10), 469-476.
334. Wolstrup, J., Grønvold, J., Henriksen, S. A., Nansen, P., Larsen, M., Bøgh, H. O., & Ilsøe, B. (1994). An attempt to implement the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections of first year grazing calves. *Journal of Helminthology*, 68(02), 175-180.
335. Wolstrup, J., Grønvold, J., Henriksen, S. A., Nansen, P., Larsen, M., Bøgh, H. O., & Ilsøe, B. (1994). An attempt to implement the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections of first year grazing calves. *Journal of Helminthology*, 68(02), 175-180.
336. Wright, D. A., McAnulty, R. W., Noonan, M. J., & Stankiewicz, M. (2003). The effect of *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of Saanen goats on pasture. *Veterinary parasitology*, 118(1), 61-69.
337. Yeates, G. W., Dimander, S. O., Waller, P. J., & Höglund, J. (2002). Environmental impact on soil nematodes following the use of the ivermectin sustained-release bolus or the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* to control nematode parasites of

- cattle in Sweden. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science*, 52(4), 233-242.
338. Yeates, G., Dimander, S. O., Waller, P., & Höglund, J. (2003). Soil nematode populations beneath faecal pats from grazing cattle treated with the ivermectin sustained-release bolus or fed the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* to control nematode parasites. *Acta Agric Scand (A)*, 53(4), 197-206.
339. Yadav, C. L., Uppal, R. P., & Kalra, S. (1993). An outbreak of haemonchosis associated with anthelmintic resistance in sheep. *International journal for parasitology*, 23(3), 411-413.

Биографски подаци

Станислав Симин је рођен 16.11.1983. у Србобрану, где је завршио и основну школу „Вук Караџић“, а затим и гимназију „Светозар Милетић“. Интегрисане академске студије ветеринарске медицине уписао је 2002. године, на Пољопривредном факултету у Новом Саду, и завршио их са просечном оценом 8,63 одбранивши мастер рад под насловом: „Желудачно-цревне и плућне стронгилиде оваца“. Током студија, бавио се истраживачким радом у области паразитологије и на 31. Међународној смотри радова студената пољопривреде у Новом Саду, освојио 2. место.

Академско усавршавање је наставио на Пољопривредном факултету у Новом Саду, уписавши 2009. године докторске академске студије Ветеринарске медицине. Од 2011. године је, у звању истраживач-сарадник, запослен на истој институцији као учесник на пројекту Министарства просвете и науке број ТР 31027 под називом, „Органска пољопривреда: унапређење производње применом ђубрива, биопрепарата и биолошких мера“. Од 2013. до 2014. године био је учесник COST акције FA 0805, посвећене паразитима коза. Поред истраживачког рада, од школске 2010/2011. године је ангажован и на извођењу практичне наставе на предметима Паразитологија и Имунологија.

Током докторских студија, боравио је на студијском усавршавању на Факултету ветеринарске медицине, Сент Иштван (Szent Istvan) Универзитета у Будимпешти, као и у Лабораторији за паразитологију и микологију Института за јавно здравље у Нишу. Похађао је низ професионалних курсева и тренинга из области Паразитологије и учествовао на бројним домаћим и међународним скуповима.

Аутор је рада објављеног у врхунском међународном часопису, који је од стране Друштва Паразитолога Србије проглашен најбољим радом објављеним током 2014/2015. године. Осим тога, коаутор је два рада објављена у међународним часописима, аутор и коаутор низа радова објављених у водећим часописима од националног значаја, као и десетак саопштења на међународним скуповима. Активан је члан Друштва Паразитолога Србије и Друштва микробиолога Србије.

Од 2016. запослен је као асистент, на Пољопривредном факултету у Новом Саду, Департман за ветеринарску медицину, у ужој научној области Микробиологија и заразне болести животиња.

Ожењен, са супругом Мирелом има два сина, Михајла и Александра.